

Aus der Klinik für Innere Medizin
Schwerpunkt Kardiologie
der Philipps – Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. B. Maisch

- Apoptose bei strukturellen Herzmuskelerkrankungen -

Inaugural – Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps – Universität Marburg

vorgelegt von
Matthias Jobmann
aus Hamburg
Marburg, 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin der
Philipps – Universität Marburg am 12.12.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. B. Maisch

Korreferent: Prof. Dr. J. Seitz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Materialien und Methoden	8
2.1	Zell - Linien	13
2.1.1	Kultur von humanen Fibroblasten	13
2.1.2	Kultur von HL – 60 Zellen	15
2.2	Patienten und Einteilungskriterien	16
2.2.1	Biopsieentnahme und Lagerung	20
2.3	Induktion der Apoptose	21
2.4	Methoden zum Nachweis einer Apoptose	24
2.4.1	Annexin / Propidiumjodid – Färbung	27
2.4.1.1	Färbung von adhärent wachsenden Zellen	27
2.4.1.2	Färbung von nicht adhärent wachsenden Zellen	28
2.4.2	DNA – laddering	29
2.4.2.1	DNA – Extraktion	29
2.4.2.2	Agarose - Gel	29
2.4.3	TUNEL – Test	31
2.4.3.1	TUNEL – Test an Zellkulturen	31
2.4.3.2	TUNEL – Test und EN 4 - Färbung an Myokardbiopsien	33
2.5	Zellfixierung	36
2.6	Statistik	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Untersuchungen an Zellkultur	39
3.1.1	Induktion der Apoptose an Fibroblasten	39
3.1.2	Induktion der Apoptose an HL – 60 Zellen	39
3.1.2.1	Auswertung der Annexin / Propidiumjodid - Färbungen	40
3.1.2.2	Auswertung des TUNEL – Tests	46
3.1.2.3	Auswertung des DNA – ladderings	51

3.2	Auswertung Endomyokardbiopsien	53
4	Diskussion	61
4.1	Diskussion der Methoden	63
4.1.1	Zellsysteme	63
4.1.2	Nachweisverfahren	64
4.2	Diskussion der Ergebnisse	67
4.2.1	Zellversuche	67
4.2.2	Endomyokardbiopsien	69
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis	78
7	Lebenslauf	89
8	Anhang	91

1. Einleitung

Die häufigste Todesursache in Deutschland sind seit Jahren kardiovaskuläre Erkrankungen (Statistisches Bundesamt Deutschland; Stand: 07 / 2001). Der Begriff der Herz- Kreislauferkrankungen schließt hierbei Erkrankungen wie beispielsweise die arterielle Hypertonie, die koronare Herzkrankheit oder auch Herzklappenveränderungen ein. Eine besondere Rolle spielen auch Kardiomyopathien, Erkrankungen des Herzmuskels.

Sie werden nach der WHO / ISFC Task force - Klassifikation von 1996 in fünf Formen unterteilt (Richardson et al., 1996):

- 1) dilatative Kardiomyopathie (DCM)
- 2) hypertrophische Kardiomyopathie (HCM)
- 3) restriktive Kardiomyopathie (RCM)
- 4) arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)
- 5) nicht klassifizierbare Kardiomyopathien (NKCM)

„Als bei weitem häufigste Form der Kardiomyopathien gilt die dilatative Form, ein überwiegend systolischer Pumpfehler, dessen Ätiologie unbekannt ist.“ (Classen et al., 1998). Die Genese der primären Form der DCM ist per definitionem unbekannt. Für die sekundären Formen finden sich Ursachen, wie Viren, Speicherdefekte, endokrine Störungen, toxische Genesen sowie Medikamentennebenwirkungen.

Von den oben genannten Kardiomyopathien sind die spezifischen Kardiomyopathien abzugrenzen, das bedeutet Herzmuskelerkrankungen, die mit kardialen oder systemischen Grunderkrankungen einhergehen. Hierzu zählen beispielsweise die ischämische, die valvuläre und auch die inflammatorische Kardiomyopathie.

Die inflammatorische Kardiomyopathie lässt sich unterteilen in die akute oder chronische Myokarditis. Die Diagnosestellung erfolgt durch die Myokardbiopsie, wobei der Nachweis von mehr als 14 Lymphozyten bzw.

Makrophagen pro mm² als pathognomonisch für die Entzündung gilt (Aretz, 1987; Maisch, 1998).

Die aus der Kardiomyopathie resultierende Symptomatik wird nach der New York Heart Association (NYHA) in vier Grade unterteilt. Sie zeigt sich in milder Form als Belastungsdyspnoe und allgemeiner körperlicher Schwäche; in progredienten Stadien als Ruhedyspnoe, tachykarde Rhythmusstörung sowie pektanginösen Beschwerden.

Morphologisch zeigen sich Schädigungen der Herzmuskelfasern und des kardialen Bindegewebes, worauf das Herz mit Umorganisation des Fasergerüsts und zellulärer Hypertrophie reagiert (Maisch, 1995 et 1996). Schreitet die Kardiomyopathie fort, zeigen sich Veränderungen und Funktionsstörungen kontraktile Elemente wie des Aktins, Myosins oder Titins (Hein et al., 1994). Eine Kompensation dieses Defizits durch zellulären Prozesse ist auch zusammen mit weiteren Mechanismen des Körpers nur kurzzeitig möglich. Systemisch kommt es zu einer Aktivierung des Renin – Angiotensin - Systems, was zu einer Volumenretention mit Anstieg des Blutdrucks führt. Zusätzlich erhöht sich die Katecholaminausschüttung. Dieser Versuch des Körpers die Homöostase aufrecht zu erhalten führt im Verlauf zum Fortschreiten der Erkrankung.

Ursächlich hierfür ist die Gefügeänderung im Myokard. Die Umorganisation der Fasern und die zelluläre Hypertrophie führen zu einer Verschlechterung der Sauerstoffversorgung. Es kommt zur myokardialen Hypoxie mit nachfolgendem Zelltod.

Der Zelltod als übergreifender Begriff ist das „irreversible Endstadium einer Zellschädigung als Folge hypoxischer, toxischer, physikalischer, immunologischer oder mikrobieller Ursachen. Zelltod ist aber auch ein physiologischer Vorgang im Rahmen der Embryonalentwicklung und des normalen Gewebsumsatzes. Der Zelltod äußert sich einerseits in Form der Apoptose und andererseits in der Form der Nekrose“ (Denk, 1997).

Der Begriff Apoptose wurde 1972 von Kerr und Mitarbeitern in eine bis dato noch in den Grundzügen stehende Forschung eingeführt. Er entstammt dem

Griechischen und bedeutet soviel wie das „Herabfallen eines Blattes von einem Baum“. Das Phänomen der Apoptose wurde erstmalig bereits 1951, damals als "shrinkage necrosis", von Glucksmann beschrieben, jedoch viele Jahre isoliert als ein winziger Teil der Embryogenese angesehen.

Seit Anfang der 80er Jahre gewann dieses Thema zunehmend bei der Untersuchung pathologischer Organprozesse an Bedeutung.

Apoptose oder auch „programmierter Zelltod“ ist: "...die genetisch programmierte Elimination von Zellen, die im Rahmen der Embryonalentwicklung und bei physiologischen Involutionsprozessen, in verstärktem Maße auch bei pathologischen Prozessen auftritt. Sie stellt die natürliche Form der Zellmauserung dar. Unter normalen Umständen besteht ein Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellverlust.“.

Die Nekrose hingegen ist: "...die Summe aller morphologischen Veränderungen, die dem Zelltod in einem lebenden Gewebe oder Organ folgen. Sie ist die Folge der Denaturierung von Proteinen und der enzymatischen Auflösung von Zell- und Gewebskomponenten.“ (Denk, 1997).

An einer Zelle, die aufgrund eines irreparablen Schadens zu Grunde geht, finden sich im frühesten Stadium der Zellschädigung noch keine morphologisch fassbaren Veränderungen. Im weiteren Verlauf des Zelluntergangs lassen sich sehr bald morphologische Korrelate erkennen, die in ihrer Summe unter dem Begriff der Nekrose zusammengefasst werden. Ein wichtiges Charakteristikum liegt in der entzündlichen Gewebsreaktion, die in vivo üblicherweise mit der Nekrose assoziiert ist (Denk, 1997).

Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose in Bezug auf Induktion und Verlaufsmorphologie und Metabolismus sind in den Tabellen 1.1 und 1.2 zusammengefasst.

Apoptose	Induktor	Nekrose	Induktor
<i>Liganden für spezielle Rezeptoren</i>	FAS -/ TNF-alpha - Liganden (Holtz et al., 1999)	<i>physikalische Einflüsse</i>	Hitze, Kälte
<i>Enzyminhibition</i>	DNA – Topoisomerase - Hemmer (Kaufmann, 1989)	<i>chemische Einflüsse</i>	Säuren, Laugen, Lösungsmittel
<i>Viren</i>	Influenza A - Virus in Monozyten (Fesq et al., 1994)	<i>biologische Einflüsse</i>	Viren, Bakterien, Parasiten

Tabelle 1.1: Induktion von Nekrose und Apoptose

Apoptose	Nekrose
Zellschrumpfung	Zellschwellung
Membran „blebbing“ mit Bildung von Apoptosekörperchen	Verlust der Membranintegrität
Entfernung der Apoptosekörperchen durch Phagozyten	entzündliche Gewebsreaktion
ATP verbrauchender, aktiver Prozess	passiver Prozess
DNA - Fragmente geregelter Größe (core DNA [146 bp] + "linker" DNA [8-100 bp])	DNA - Fragmentierung ohne geregeltes Muster

Tabelle 1.2: morphologische und metabolische Unterschiede von Nekrose und Apoptose

Wie sich in den letzten 25 Jahren Forschung zeigte, ist der physiologische Regulationsmechanismus der Apoptose kompliziert und über viele Wege mit anderen Regelkreisen des Körpers verbunden. So sind zum Beispiel Glukokortikoide in der Lage selektiv Apoptose in Thymozyten zu induzieren (Wyllie, 1980).

Es wurden in den letzten Jahren viele endo- und exogene Substanzen gefunden, die in der Lage sind die Apoptose zu induzieren oder zu inhibieren (Thatte et al., 1997).

Die Apoptose wird über intrazelluläre Proteine und Enzyme moduliert; durch die Bcl-2 - Proteinfamilie und die Caspasen. Ihre Wirkung auf die Apoptose ist hierbei nicht eindeutig, sondern wird vielmehr über die Verschiebung von Gleichgewichten gesteuert. So finden sich in der Gruppe der Bcl-2 - Genfamilie bisher zwölf verschiedene Proteine, die teilweise sowohl als Inhibitor wie auch als Promotor wirken können. (Nunez et al., 1994; Shu-Jen, 1998).

Die Caspasen stellen eine Gruppe von Enzymen dar, die das Signal nach Rezeptoraktivierung in der Zelle fortleiten. Diese Übertragung erfolgt ähnlich dem des Gerinnungssystems über eine kaskadenartige Aktivierung (Cohen, 1997; Shu-Jen, 1998).

Die Induktion der Apoptose erfolgt in erster Linie rezeptor- und ligandengesteuert. Bei den beteiligten Proteinen handelt es sich um Vertreter der TNF (Tumor Nekrose Faktor) - Rezeptorenfamilie. Hauptsächlich beteiligt ist der FAS - Rezeptor (FS 7 associated surface antigen), der in der Literatur auch als CD 95 oder Apo - 1 bezeichnet wird (Nagata et al., 1995). Er kann sowohl membranassoziiert (FAS) als auch in gelöster Form (sFAS) vorliegen. Am Rezeptor induziert der FAS - Ligand (FAS-L) Apoptose. Dieser Ligand liegt ebenfalls in membrangebundener und gelöster Form (sFAS-L) vor. Diese verschiedenen Formen von Ligand und Rezeptor zeigen bereits die erste Möglichkeit der Regulation; so kann ein gelöster Rezeptor einen Liganden blockieren und somit einerseits Apoptose verhindern, andererseits kann eine Erhöhung der Ligandenexpression Apoptose induzieren (Nishigaki et al., 1997).

Vergleichbare Wirkungen besitzen der TNF - alpha - Rezeptor und sein Ligand (Holtz et al., 1999). Diese Interaktion wurde an verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen, z. B. an Keratinozyten der HaCaT - Linie (Reinartz et al., 1996), an humanem neuronalen Gewebe (Talley et al., 1995) oder humanen Adipozyten (Prins et al., 1997). Das Zytokin TNF - alpha oder auch Kachektin

ist ein von Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen produzierter Mediator mit Wirkung auf Blutbildung, Entzündungsreaktionen, Angiogenese sowie den Lipid – und Proteinstoffwechsel. Zusätzlich besitzt TNF - alpha zytostatische und zytolytische Wirkung auf Tumorzellen (Maury, 1986) bestimmten Ursprungs, welches auch durch die Apoptoseinduktion erklärt wird. Die Apoptose ist an vielen pathologischen Veränderungen im menschlichen Körper beteiligt (Thatte et al., 1997) und lange Zeit fiel ein besonderes Augenmerk der Forschung auf neoplastische (Pan et al., 1997) und autoimmunologische Erkrankungen (Cohen et al., 1992).

Die Rolle der Apoptose bei Herzerkrankungen wurde Mitte der 90er Jahre erstmals untersucht. Erste Untersuchungen zu diesem Thema befassten sich mit Vorgängen am Tiermodell (Kajstura et al., 1996), an explantierten Herzen und an Sektionsmaterial (Olivetti et al., 1997; Saraste et al., 1997; Valente et al., 1998).

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz konnte eine Erhöhung des TNF - alpha Serumspiegels beschrieben werden (Levine et al., 1990). Dieses Phänomen schien unabhängig der Ätiologie der Herzinsuffizienz zu sein. Es zeigten sich diese Ergebnisse bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie genauso wie bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Torre – Amione et al., 1996). Da der TNF - alpha eine wichtige Rolle bei der Apoptoseinduktion spielt, könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Apoptose eine Rolle in der Ätiologie oder Progredienz von Kardiomyopathien spielt (Maisch, 1999; Schaper et al., 1999) .

Ob die Apoptose bei inflammatorischen und dilatativen Kardiomyopathien eine Rolle spielt, soll diese Arbeit untersuchen.

Es wurden daher Untersuchungen an Myokardbiopsien von Patienten mit Kardiomyopathien durchgeführt.

Sie wurden folgenden Gruppen zugeordnet:

- 1) akuter Herzmuskelentzündung
- 2) chronischer Herzmuskelentzündung
- 3) dilatativen Kardiomyopathien
- 4) Borderline - Myokarditis mit Nachweis von Adenovirusgenom im Myokard
- 5) Borderline - Myokarditis mit Nachweis von Zytomegalievirusgenom im Myokard
- 6) Borderline - Myokarditis mit Nachweis von Enterovirusgenom im Myokard
- 7) dilatativen Kardiomyopathien mit entzündlicher Infiltration

2. Material und Methoden

Die in der Arbeit beschriebenen Zellkulturen und Versuche wurden mit unten genannten Chemikalien und Lösungen durchgeführt.

Bei unterschiedlichen oder abweichenden Konzentrationen sind diese bei den einzelnen Versuchsbeschreibungen angegeben.

Aceton, Riedel de Heän

Actinomycin D, Sigma; Approx. 98 %

Agarose, Sigma

Alkaline Phosphatase Standard, Vectastain AK 5000

Alkaline Phosphatase Substrate Kit III, Vector / SK 5300

Amphotericin B Solution, Sigma / 250 µg / ml

Annexin V / FITC - Kit, Bender med Systems

CPT 11 / Camptosar, Rhone-Poulanc-Rorer GmbH

Dexamethason, Merck (Fortecortin)

DNA Standard 100 bp, GibcoBRL

DNase I, Sigma; E.C. 3.1.21.1

EN 4 Antikörper, Monosan

Ethanol abs., Riedel de Heän

Ethidiumbromid, 50 mg / 5 ml

Etoposid / Vepesid, Bristol Arzneimittel

Formalin 4 %

Gentamycin Solution, Sigma ; 50 mg / ml deionized water

Kaiser's Glycergelatine zur Mikroskopie, Merck

Loading Buffer, Sigma

Maus IgG, Vectastain / Elite PK 6102

Methanol, J.T. Baker; (> 99,8 %)

PenStrep - Penicillin / Streptomycin Solution, Sigma / 10000 Units Penicillin und 10 mg Streptomycin / ml NaCl 0.9 %

Proteinase K, Sigma, Solution in 10 mM Tris - Cl, pH 7,5; 600 mAU / ml (Apr. :20 mg / ml)

QIAamp blood kit, Qiagen

Sodium Citrat, Sigma

TBE Puffer, (1 x)

Triton X 100, Sigma

TRIZMA - Hydrochlorid, Sigma, 100 mM

Trypan Blau, Sigma

Trypsin EDTA Solution, Gibco BRL

TUNEL – Test (In Situ Cell Death Detection Kit, POD) / Boehringer Mannheim

Medien

DMEM with Glutamax-I:

Gibco 21885-025, 500 ml, Lagerung Kühlschrank

RPMI with Glutamax-I:

Gibco 61870-010, 500 ml,

PBS Dulbeccos:

Gibco 14190-094. 500 ml,

Fötales Kälberserum (FBS):

Gibco 10270-106, 500 ml,

HumanSerum:

Sigma H-2520

Fibroblast Growth Factor (FGF)

Sigma F-3133, 10 µg / vial,

in 2 ml PBS lösen, Aliquote à 100 µl = 500 ng

BM-Cyclin 1+2, Antibiotika Kombination; Boehringer Mannheim 799050,

1 = 25 mg, 2 = 12,5 mg, jeweils in 10 ml PBS lösen, Aliquote à 100 bzw. 250 µl,

1 = 100 µg / 40 µl, 2 = 50 µg/ 40 µl, Lagerung –20 °C

Fibroblasten:

Transportmedium:

50 ml DMEM

0,5 ml Gentamycin

0,5 ml PenStrep

0,5 ml Amphotericin B

Waschmedium:

für Präparation siehe Transportmedium

Anzuchtmedium:

90 ml DMEM

10 ml Humanserum

1 ml Gentamycin

1 ml PenStrep

1 ml Amphotericin B

längstens 4 Wochen verwenden

vor Gebrauch Zugabe von

100 µl FGF pro 10 ml Medium

Kulturmedium:

500 ml DMEM

55 ml FBS

2,75 ml Gentamycin
5,5 ml PenStrep
5,5 ml Amphotericin B
im Kühlschrank aufbewahren
längstens 4 Wochen verwenden

HL-60 - Zellen:

Kulturmedium:

500 ml RPMI
55 ml FBS
2,75 ml Gentamycin
5,5 ml PenStrep
5,5 ml Amphotericin B
längstens 4 Wochen verwenden

Zell - Linien:

HL – 60 Zellen, ACC 3, DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
und Zellkulturen GmbH

Geräte:

Objektträger, NUNC
Gelkammern: Pharmacia Biotech GNA 200

Kulturflaschen, Nuclon Delta

Rüttler: IKA VIBRAX VXR

Spannungsgerät: Pharmacia Biotech; Electrophoretic Power Supply EPS 300

Spritzenvorsatzfilter; Minisart 0.2 μm , Fa. Sartorius

Vortex: Heidolph REAX 300

Zentrifugen: Fa. Heräus

2.1. Zell - Linien

Alle im folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die eingesetzten Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur vorgewärmt.

Die Kultur erfolgte unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Die Zellen wurden in den angegebenen Mengen verteilt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Trypanblau – Ausschlusstest.

Hierzu wurden 10 µl einer 1 : 10 verdünnten Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt.

In einer Neubauer Zählkammer wurden die avitalen (Trypanblau positive) und die vitalen Zellen (Trypanblau negative) ausgezählt. Es wurden hierzu die vitalen Zellen in 4 Eckquadraten mit 16 kleinen Quadraten ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

Die Zellzahl pro ml errechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Zellen / ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Tabelle 2.1: Berechnung vitaler Zellen

2.1.1. Kultivierung von Fibroblasten des Menschen aus kindlichem Vorhautgewebe

Fibroblasten aus humanen Vorhaut – Präparaten wurden in 50 ml Nuclon Delta Kulturflaschen angezüchtet. Es wurden in den Boden der Kulturflasche mit einem sterilen Skalpell mehrere Kreuze eingeritzt und hierauf später das vorbehandelte Präparat platziert. Das Gewebe wurde frisch aus dem Op verarbeitet. Hierzu wurden mehrere Hautstücke zu etwa 10 mm² Größe zerschnitten und in mehreren Waschschritten in DMEM - Medium von Blut und

Detritus befreit. Das Präparat wurde jetzt in der Kulturflasche ausgesetzt und mit 5 ml Anzuchtmedium umspült.

Das Anzuchtmedium bestand aus :

10 ml Humanserum, das mit 1 ml Gentamycin, 1 ml PenStrep und 1 ml Amphotericin in ein kleines steriles Becherglas pipettiert wurde. Von hier aus wurde diese Lösung durch ein Spritzenvorsatzfilter in 90 ml DMEM - Medium überführt.

Direkt vor dem Gebrauch in der Anzuchtphase wurden 10 µl FGF (fibroblast growth factor) pro ml Medium hinzugegeben.

Das so behandelte Präparat verblieb zirka 4 Tage im Brutschrank, wobei am 2. Tag das Medium gewechselt wurde.

War am 4. Tag ein kleiner Zellrasen erkennbar, so wurden die Hautstückchen entfernt, es folgte ein weiterer Mediumwechsel.

Das Umsetzen und Teilen der Zellen erfolgt in mehreren Schritten. Nach dem Abgießen des alten Mediums und zweifachen Waschen mit PBS folgt eine 10 minütige Inkubation (37° C) mit 5 ml Trypsin - EDTA, welches durch ein Spritzenvorsatzfilter direkt in die Flasche gegeben wurde.

Durch ein- und auspipettieren konnte eine gleichmäßige Suspension der Zellen gewährleistet werden, die durch Zugabe von 35 ml Medium verdünnt wurde. Diese 40 ml Zellsuspension wurden steril in ein 50 ml Falcon Tube überführt und bei 800 U/min für 8 min zentrifugiert. Der Überstand konnte dekantiert und das Zentrifugat in 50 ml PBS resuspendiert werden. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Palett in 10 ml Kulturmedium resuspendiert.

Je nach Dichte konnte jetzt eine Verdünnung mit weiteren 30 ml Medium erfolgen und somit ein 1:4 Aufteilen in 200 ml Kulturflaschen. Im weiteren Verlauf erfolgte ein Mediumwechsel alle 2 Tagen sowie ein Teilen 1 mal pro Woche.

Das Kulturmedium setzte sich zusammen aus: 500 ml DMEM, dem durch einen Spritzenvorsatzfilter 55 ml FBS, 2,75 ml Gentamycin, 5,5 ml PenStrep sowie

5,5 ml Amphotericin B zugesetzt wurde. Hierbei wurde der Filter nach 20 ml Filtrationsmenge gewechselt.

2.1.2. Kultivierung von HL – 60 Zellen (humane Promyelozyten):

Bei der Suspensionszelllinie HL – 60 handelt es sich um eine promyelozytische Leukämiezelllinie, die 1977 von Collins et al. eingeführt wurde.

Die Anzucht erfolgte aus tief gefrorenen Zellen (- 80° C), die in einer Dichte von $1,5 - 2 \times 10^6$ / ml vorlagen.

Das Tube wurde unter handwarmem Wasser aufgetaut und die Suspension in ein Falcon Tube mit 50 ml Kulturmedium überführt.

Das Kulturmedium setzt sich zusammen aus 500 ml MEM Eagle, dem 55 ml FBS, 2,75 ml Gentamycin, 5,5 ml Pen – Strep sowie 5,5 ml Amphotericin mittels Sterilfiltration hinzugegeben wurden.

Es folgte eine Zentrifugation mit 1200 U/min über 8 min.. Das so entstandene Zentrifugat wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 200 ml Kulturflasche gegeben.

Die Kultur wurde alle 1 - 2 Tage 1 : 2 bis 1 : 5 geteilt, so dass sich Subkulturen in der Dichte von $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen / ml ergaben.

Die umzusetzende Zellsuspension wurde hierzu aus der Kulturflasche in ein Falcon Tube umpipettiert und bei 1200 U/min für 8 min. zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert und das Zentrifugat in 10 ml Kulturmedium resuspendiert.

Es schloss sich ein identischer Waschschrift an, danach erfolgte die Aussaat in 200 ml Kulturflaschen.

2.2. Patienten und Einteilungskriterien

Die Untersuchung umfasste Endomyokardbiopsien von 67 Patienten, die sich in den Jahren 1998 und 1999 einer Herzkatheteruntersuchung unterzogen.

Die Biopsien der Patienten wurden acht Gruppen zugeteilt, wobei sich die Zuordnung aus der Beurteilung der Myokardbiopsie, der Herzkatheteruntersuchung und einer Echokardiographieuntersuchung ergab.

- 1) akute Myokarditis, (n=1)
- 2) chronische Myokarditis, (n=8)
- 3) dilatative Kardiomyopathie mit entzündlicher Komponente (DCMi), (n=9)
- 4) Borderline Myokarditis mit Adenovirus (ADV) – Genom Nachweis, (n=9)
- 5) Borderline Myokarditis mit Zytomegalie (CMV) – Genom Nachweis, (n=6)
- 6) Borderline Myokarditis mit Enterovirus (EV) – Genom Nachweis, (n=7)
- 7) idiopathische dilatative Kardiomyopathie, (n=15)
- 8) Kontrollgruppe, (n=12)

Die immunzytologische Bewertung wurde durch das kardiologisch - immunologische Labor, Prof. Dr. Maisch, Marburg durchgeführt, ebenso die immunhistochemischen Untersuchungen.

Die histologische Untersuchung und Bewertung erfolgte nach den Dallas Kriterien zur Einteilung der Myokarditiden (Aretz, 1987), durch das Institut für Pathologie, Prof. Dr. Moll, Marburg und durch das „Department of Histopathology“ des Royal Brompton Hospitals, Prof. Dr. Olsen, London.

Die Zuordnung der Patienten zur Gruppe der dilatativen Kardiomyopathie mit Entzündungskomponente erfolgte durch die Kombination der histologischen und immunhistologischen Befunde. Im immunhistologischen Befund galt der Nachweis von mehr als 14 Lymphozyten (CD2, CD3, CD4, CD8, CD45RO, T200) und Makrophagen (CD11c, CD14) / mm² oder eines oder mehrerer Infiltrate als pathognomonisch für die Entzündung (Maisch, 1998 et 2000)

Als Kriterium für die Dilatation des Herzens wurde der echokardiographisch ermittelte LVEDD (left ventricular end diastolic diameter) verwendet und in

Relation zu Normwerten nach Henry gesetzt. Der so ermittelte „Henry - Index“ (Henry et al., 1980), wurde bei Werten über 117 % als pathologisch bewertet.

Ein zusätzliches Charakteristikum stellt eine reduzierte EF (Ejektionsfraktion; Norm: 55 – 80 %) dar.

Dieser Gruppe wurden 16 Patienten, die diese Kriterien erfüllten, im Alter zwischen 28 und 81 (im Mittel: 53) zugeteilt, wobei das Geschlechterverhältnis w : m, 6 : 12 betrug.

Den folgenden drei Gruppen, den Borderline Myokarditiden mit Nachweis von Virus - Genom im Myokard, wurden Patienten zugeteilt, in deren Myokardbiopsie mittels PCR der Nachweis von Virus - DNA oder - RNA (im Falle von Enterovirus) gelang, der anschließend mit dem Southern Blot validiert wurde.

Es fanden sich 11 Patienten zwischen 25 und 70 Jahren (im Mittel: 48; w : m – 2 : 9) mit einer positiven PCR für Adenovirus, 6 Patienten zwischen 33 und 70 Jahren (im Mittel: 55; w : m – 2 : 4) mit positiver PCR für Zytomegalie Virus - Genom und 4 Patienten zwischen 34 und 58 Jahren (im Mittel: 46; w : m – 2 : 5) mit enteroviraler RNA in der Myokardbiopsie.

Die fünfte Gruppe umfasste 13 Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie. Zusätzlich zum erhöhten Henry - Index und der reduzierten EF, war eine Myokardbiopsie obligat, in der weder Infiltrate noch Virus - Genom nachweisbar waren. Diese Patienten waren zwischen 28 und 63 Jahren alt (im Mittel: 44; w : m – 2 : 11).

Als Kontrollgruppe dienten 15 Patienten zwischen 16 und 72 Jahren (im Mittel: 47; w : m – 7 : 8), die wegen unklarer Herzbeschwerden biopsiert wurden und bei denen eine Myokarditis und eine Kardiomyopathie ausgeschlossen werden konnte.

Die einzelnen hämodynamischen Parameter sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Es wurden hier für die Beurteilung der Herzfunktion der „Cardiac Index“ benutzt. Dieser setzt das Herzminutenvolumen in Relation zur Körperoberfläche. Zusätzlich wurden die Ejektionsfraktion und die pulmonalarteriellen Drücke herangezogen (PAP).

	N		PAP sys [mm HG]	PAP diast [mm HG]	PAP Mitteld. [mm HG]	CI [l/min/m ²]	EDV [ml]	EDVI [ml/m ²]	LVEDD [mm]	Henry [%]	EF [%]
akute Myokarditis	1		52	29	34	1,01	220	141	n.b.	n.b.	n.b.
chronische Myokarditis	8	Mittelwert	33,88	16	22,88	2,72	157,50	85,63	47,25	101,30	78,63
		Median	34	15,50	23	2,82	155	90,50	46,50	101	79
		SD	9,46	8,11	8,84	0,79	40,87	18,17	3,11	4,79	6,41
DCMi	9	Mittelwert	32	18	23,88	2,24	309,67	149,44	67,13	136,65	40,33
		Median	28	15,50	20,50	2,48	284	164	67,50	138,20	30
		SD	17,90	15,38	15,85	0,81	155,89	65,99	5,74	8,72	27,14
Borderline Myokarditis ADV	9	Mittelwert	35,25	15,13	24,38	3,39	191	97,89	54,44	112,18	56,22
		Median	33,50	14	23	3,32	201	90	52	111,40	68
		SD	16,74	13,02	15,28	1,08	59,82	29,23	7,02	13,55	27,18
Borderline Myokarditis CMV	6	Mittelwert	25,60	6,60	15,40	2,74	212	116,50	61,17	129,13	37,17
		Median	28	6	15	2,61	224,50	117,50	61	124,25	37,50
		SD	7,16	9,15	5,55	0,32	60,20	45,64	6,11	14,83	7,73
Borderline Myokarditis EV	7	Mittelwert	21,80	7,20	14,40	2,78	275,29	146,57	59,43	124,93	44,29
		Median	21	8	11	2,37	207	119	57	119,60	45
		SD	6,83	5,26	6,07	1,43	140,63	68,10	13,82	25,79	8,24
DCM	15	Mittelwert	43,50	20,64	30,75	2,29	323,60	162,80	64,50	132,29	42,13
		Median	44	23	30	2,15	310	150	65	131	43
		SD	10,02	5,97	6,37	0,45	114,55	50,09	5,13	9,92	22,29
Kontroll- gruppe	12	Mittelwert	25,09	7,60	14,09	2,80	187,58	99	48,11	99,78	75,92
		Median	23	7,50	14	2,98	184	83	47,95	100	75,50
		SD	7,75	4,14	6,07	0,77	54,12	28,92	4,96	7,36	8,82

Tabelle 2.1: hämodynamische Parameter der einzelnen Patientengruppen

(PAP: Pulmonalarterieller Druck, systolisch, diastolisch, Mitteldruck [mm Hg]; CI: cardiac - index [l/min/m²]; EDV: Enddiastolisches Volumen [ml]; EDVI: Enddiastolischer Volumen - Index [ml/m²]; LVEDD: links ventrikulärer enddiastolischer Diameter [mm]; Henry - Index: empirischer Index des LVEDD in Abhängigkeit von Alter und Gewicht [%]; EF: Ejektionsfraktion [%], n.b. : nicht bekannt; SD: Standardabweichung.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit Begleiterkrankungen, bei denen die Apoptose im Rahmen der systemischen Grunderkrankung auftreten könnte und so eine Beeinflussung denkbar ist.

Es handelte sich um folgende Patienten mit:

- Krankheiten des neoplastischen Formenkreises (hier: Leukämie, M. Hodgkin, Bronchial - Karzinom), unabhängig vom Zeitpunkt des Auftretens oder Art der Therapie.
- Krankheiten mit autoimmunologischer Genese (hier: Lupus erythematodes, Arteriitis nodosa)
- Speichererkrankungen (hier: Hämochromatose, Amyloidose)
- kardiale Nebenerkrankungen (hier: koronare Herzkrankheit, bekannte Herzvitien mit hämodynamischer Wirkung und Herzinfarkt in der Anamnese)

Ein bekannter Hypertonus führte nicht zum Ausschluß aus der Untersuchung.

2.2.1. Biopsieentnahme und Lagerung

Mittels eines Biotoms wurden pro Patient sechs Biopsien in verschiedenen Bereichen des linken Ventrikels entnommen. Diese wurden mit einer sterilen Pinzette entgegengenommen und in eine Petrischale überführt.

Zwei der Proben wurden in ein steriles Probenröhrchen eingebracht und in flüssigem Stickstoff bei -196°C „schockgefroren“. Diese wurden nach dem Transport bei -80°C gelagert und der PCR oder der immunhistologischen Untersuchung zugeführt.

Zwei weitere Proben für die Untersuchung durch die Pathologie wurden direkt in gepuffertem Formalin (3,7 %) fixiert.

Die Verarbeitung erfolgte umgehend, wobei $6\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte für die Biopsiebeurteilung bei -20°C auf einem Kryotom gefertigt wurden.

Die längerfristige Lagerung der so vorbereiteten Biopsieschnitte erfolgte bei -80°C .

2.3. Induktion der Apoptose

Zur Etablierung der Nachweismethoden wurde in der Zellkultur Apoptose induziert und durch Annexin / Propidiumiodid Färbung und den TUNEL - Test quantitativ, sowie mit dem DNA - laddering qualitativ nachgewiesen.

An den Zellkulturen wurden mittels verschiedener Stoffe Zeit- und Konzentrationsmessreihen durchgeführt.

Die benutzten Agenzien sind als apoptoseinduzierend in der Literatur genannt, häufig liegt jedoch für die Induktionsfähigkeit eines Stoffes eine Spezifität für bestimmte Zelllinien vor (Kaufmann, 1989).

Die Inkubation der Zellen mit den einzelnen Agenzien erfolgte durch die Zugabe dieser in entsprechender Konzentration zum normalen Kulturmedium. Am Ende des Inkubationszeitraums wurden die Zellen gewaschen und mit frischem Nährmedium umspült. Die Nachinkubationszeit ist der Zeitraum, der zwischen dem Ende der Inkubationszeit und dem Apoptosenachweis verging.

Die humanen Fibroblasten wurden in verschiedenen Konzentrationen mit Dexamethason, Camptosar und Taxol inkubiert, außerdem wurden sie mit UV - Licht bestrahlt.

Fibroblasten	Konzentrationen (mg/ml)	Zeit / Stunden (Inkubation)	Zeit / Stunden (Nachinkubation)
Dexamethason	2; 1,25; 0,625; 0,0625	1; 2	4; 6; 8
Camptosar	0,02; 0,01; 0,005	1	0; 4; 8; 12
Taxol	0,012; 0,0012; 0,0001	1	0; 4; 8; 12
UV - Licht		5 min, 10 min, 15 min	0; 4; 8; 12

Tabelle 2.2: Induktionsversuche an humanen Fibroblasten

Die HL – 60 Zellen wurden folgenden Agenzien ausgesetzt, um Apoptose zu induzieren:

HL - 60	Konzentrationen (mg/ml)	Zeit / Stunden (Inkubation)	Zeit / Stunden (Nachinkubation)
Camptosar	0,02; 0,01; 0,005	1	0; 4; 8; 12
Etoposid	0,16; 0,08; 0,04	2	0; 4; 12; 16; 22
UV - Licht		15 min	0; 4; 12; 16; 22

Tabelle 2.3: Induktionsversuche an HL – 60 Zell - Linie

Die verwendeten Stoffe besitzen unterschiedliche Angriffspunkte im Zellzyklus.

Camptosar ist die wasserlösliche Form des Camptothecins.

Camptothecin ist ein Chinolinalkaloid, das aus dem Holz des in China verbreiteten *Camptotheca acuminata* Decne gewonnen wird und besonders bei Leukämien zytostatisch wirken soll. Auf zellulärer Ebene hemmt es die Topoisomerase I, die für das ATP - abhängige „Supercoiling“ verantwortlich ist.

Etoposid ist der Freiname für das synthetische Zytostatikum

4'-Desmethylepipodophyllotoxin- (4,6 –O- ethyliden- glucosid), das heute u. a. einen Teil der Chemotherapie bei Hodentumoren darstellt und durch Inhibition der Topoisomerase II wirkt.

Taxol hingegen, das in der pazifischen Eibe *Taxus baccata* *brevifolia* vorkommt, wirkt durch die Hemmung der Depolymerisation von Mikrotubuli zu Tubulin. Es resultiert eine Störung der Zellteilung. Es findet klinischen Einsatz bei der Behandlung von Tumoren des Uterus und der Harnblase.

Dexamethason als Kortikosteroid bindet auf zellulärer Ebene an Steroidrezeptoren im Zellkern und lagert sich im weiteren als Komplex an die

so genannten „response elements“ der DNA an, um somit regulatorischen Einfluss auf die Transkription zu nehmen.

Außer den beschriebenen Inkubationen wurde bei jedem Ansatz eine „Nekrose – Probe“ hergestellt, indem die Zellen im Medium für 15 min. einer Temperatur von 80° C ausgesetzt wurden. Hierzu wurden die Kulturflaschen, ohne den Mikrofilter zu befeuchten, in ein auf 80° C temperiertes Wasserbad eingelegt und für 15 min. belassen. Die weitere Behandlung erfolgte analog der anderen Proben.

Als „positive“ Kontrolle für den TUNEL - Test der HL – 60 Zellen wurde eine Inkubation mit DNase I (in PBS 1x) in der Konzentration von 1 U / ml für 15 min. bei 37° C durchgeführt (Boehringer Mannheim; technischer Support zum Enzym; Saraste et al., 1997). Dies ist im Protokoll des TUNEL - Testes beschrieben.

Bei jedem Ansatz wurde der Nachweisversuch mit dem DNA – laddering, dem TUNEL – Test und der Annexin / Propidiumjodid - Färbung, wie in den Protokollen beschrieben, durchgeführt.

2.4. Methoden zum Nachweis einer Apoptose

Zum Nachweis der Apoptose haben sich bisher drei Standardverfahren etabliert, die jedes für sich sowohl Vor- als auch Nachteile besitzen. Anhand dieser drei Methoden wurde das Zellmodell entwickelt und validiert.

Annexin / Propidiumjodid - Färbung:

In vitalen Zellen findet sich unter physiologischen Bedingungen eine asymmetrische Verteilung verschiedener Phospholipide zwischen intra- und extrazellulär.

Es zeigen sich Phosphatidylcholin und Sphingomyelin hauptsächlich extrazellulär; wohingegen Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin nach intrazellulär gerichtet sind. (Op de Kamp, 1979; Zachowski, 1993).

Die Zellen können das Phosphatidylserin (PS) auf bestimmte Stimuli, nach extrazellulär translozieren (Martin et al., 1995).

Diese veränderte Phospholipidanordnung scheint bei der Erkennung apoptotischer Zellen durch Makrophagen eine entscheidende Rolle zu spielen (Benett et al., 1995).

Mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markiertes Annexin bindet an dieses Phospholipid (van Engeland et al., 1998) und kann so mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie (Vermes et al., 1995) nachgewiesen werden.

Die Unterscheidung zur Nekrose erfolgt über Gegenfärbung mit Propidiumjodid (PJ). Propidiumjodid ist ein Stoff, der in DNA - Stränge interkaliert. Eine fehlende Färbung zeigt somit eine intakte Membranintegrität und schließt die Nekrose aus. Vor- und Nachteile dieser Methode sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Vorteile	Nachteile
eindeutige Unterscheidung zur Nekrose	vitale Zellen sind obligat
Messung mittels "Durchflusszytometrie" möglich	keine Gewebs- oder Biopsiebeurteilung möglich
relativ geringer Zeitaufwand	
Beurteilung auf Einzelzellniveau möglich	

Tabelle 2.4: Vor- und Nachteile der Annexin / Propidiumjodid - Färbung

Bei dieser Nachweismethode können vier verschiedene Färbekombinationen erwartet werden, die folgende Interpretationen zulassen:

Beobachtete Färbung	Interpretation
Annexin und Propidiumjodid negativ	vitale Zelle
Annexin - Färbung negativ, PJ positiv	nekrotische Zelle
Annexin - Färbung positiv, keine PJ - Färbung	apoptotische Zelle
Annexin - und PJ - Färbung positiv	nekrotische Zelle

Tabelle 2.5: Färbevariationen der Annexin / Propidiumjodid - Färbung

DNA - laddering:

Während der Apoptose wird die DNA durch Endonukleasen fragmentiert, es entstehen primär sehr große DNA Bruchstücke, später Fragmente zwischen 140 und 220 bp und deren Vielfachen.

Diese Größe ergibt sich aus "Histon - assoziierter DNA (etwa 140 bp)" + "Linker - DNA (etwa 20-80 bp)" und deren Vielfachen.

Diese DNA lässt sich mittels Agarose - Gel - Elektrophorese nachweisen.

Es ergibt sich ein typisches "Leitermuster".

Vorteile	Nachteile
hohe Effizienz	nutzbar erst ab Zellmengen von zirka 500.000 Zellen
durch das typische Leitmuster sehr gute Unterscheidung zur Nekrose	eine Quantifizierung der Apoptose ist nicht möglich

Tabelle 2.6: Vor- und Nachteile des DNA - laddering

TUNEL - Test: (terminal dUDP nick end labeling)

Ein wichtiges biochemisches Merkmal der Apoptose ist die Aktivierung intrazellulärer Ca^{2+} - und Mg^{2+} - abhängiger Endonukleasen (Wyllie, 1980), die zu einer Fragmentierung der DNA führt. Daraus resultiert eine Zunahme der freien 3' - OH Enden. Man macht sich dieses zu Nutze, indem man durch eine Transferase an die jetzt vielfach vorhandenen freien 3' - Enden ein mit Fluoreszein - markiertes dUDP substituiert. Mit Peroxidase verknüpfte Fluoreszein - Antikörper binden an das Fluoreszein und nach POD - Substratzugabe kommt es zur selektiven Anfärbung in der Umgebung der fragmentierten DNA.

Vorteile	Nachteile
Nutzbar auch an der Biopsie	keine eindeutige Abgrenzung zur Nekrose
Beurteilung der Einzelzelle möglich	

Tabelle 2.7: Vor- und Nachteile des TUNEL – Test

Für die Unterscheidung zur Nekrose müssen beim Einsatz des TUNEL - Tests zusätzlich morphologische Kriterien herangezogen werden (Saraste, 1999).

Eine mögliche Kombination dieser drei Methoden scheint zur Zeit der sicherste Weg eine valide Aussage bezüglich der Apoptose zu treffen.

2.4.1. Annexin / Propidiumjodid - Färbung

2.4.1.1. Färbung von adhärent wachsenden Zellen (Fibroblasten)

Diese Zell - Linie wurde für die Versuche mit Annexin / Propidiumjodid - Färbung auf Objektträgern kultiviert. Die Induktion mit den entsprechenden Agenzien erfolgte ebenfalls in diesen gekammerten Objektträgern.

Zur Inkubation wurde das Kulturmedium abgegossen und der verbliebene Rest durch vorsichtiges Ausklopfen möglichst vollständig entfernt.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, indem die einzelnen Kammern mit PBS (1x) befüllt und für je 5 min. auf dem Rüttler bewegt wurden. Nach Entfernung des PBS (1x) auf oben beschriebene Weise schloss sich die Inkubation mit den Induktionsstoffen an. Diese erfolgte im Wärmeschrank.

Nach Ablauf der Induktionsdauer folgte eine zweifache Waschung mit PBS (1fach) für je 10 min. auf dem Rüttler.

Bei entsprechender Nachinkubation wurden die Zellen erneut mit Kulturmedium überschichtet und in den Wärmeschrank überführt.

Zur Färbung wurden die Zellen nach Mediumentfernung mit PBS (1x), wie oben, gewaschen. Nach Entfernung des PBS durch Abgießen wurden die Zellen mit 390 µl „Binde - Puffer“ (1:4 mit Aqua dest. verdünnt) zu dem 10 µl „Annexin V - FITC“ hinzugefügt waren, überschichtet und dunkel für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte ein Waschschritt mit 2 ml PBS (1x) für 5 min. auf dem Rüttler in Dunkelheit.

Nach Überschichtung mit 380 µl „Binde - Puffer“ folgte die Zugabe von 20 µl Propidiumjodidlösung (20 µg/ml), zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml für 10 min..

Im Anschluss wurde die Lösung abgegossen und der Objektträger mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet (488 nm zur Anregung).

2.4.1.2. Färbung von nicht adhärent wachsenden Zellen (HL – 60)

Die für die Inkubation vorgesehenen Zellen wurden 10 min. bei 800 U/min zentrifugiert, das entstandene Zentrifugat in 10 ml PBS resuspendiert und erneut bei 800 U/min in der Zentrifuge verarbeitet. Es folgte die Resuspension in 10 ml der Induktionslösung und Ausbringen der Suspension in eine Kulturflasche. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen aus der Kulturflasche entnommen und 10 min. bei 800 U/min. abzentrifugiert.

Anschließend wurde das entstandene Zentrifugat in 10 ml PBS resuspendiert und erneut 10 min. bei 800 U/min. abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Sollte sich eine Nachinkubationszeit anschließen, so erfolgte die Resuspension in Kulturmedium und erneutes Beschicken einer Kulturflasche. Bei direkter Färbung erfolgt die Resuspension in „Binde - Puffer“ (1:4 in Aqua dest. verdünnt) und Vorlage von 195 µl Zellsuspension (Dichte ca. 2×10^5 Zellen / ml). Nach Zugabe von 5 µl Annexin V - FITC und 10 min. Inkubation in Dunkelheit folgte ein Waschschrift mit PBS, (Abzentrifugation bei 800 U/min für 10 min., Resuspension in 5 ml PBS und erneutes Abzentrifugieren) und Aufnehmen des Zellpaletts in 190 µl „Binde - Puffer“. Zugabe von 10 µl Propidiumjodid - Lösung (20 µg / ml) und Auswertung durch Fluoreszenzmikroskopie bzw. Durchflusszytometrie.

2.4.2. DNA - laddering

2.4.2.1. DNA - Extraktion

Die Zellen wurden entsprechend der Protokolle inkubiert, danach zweifach in PBS gewaschen und dem DNA – laddering zugeführt.

Eine Kulturflasche mit 10 ml Medium bei einer Zellzahl von 10^5 / ml wurde komplett verarbeitet. Die Zellen wurden bei 800 U/min für 10 min. abzentrifugiert und das Zentrifugat in 200 µl PBS Puffer aufgenommen.

Die folgenden Schritte wurden mit dem „Quiagen blood kit“ zur DNA - Isolierung durchgeführt.

Es folgte die Zugabe von 25 µl Proteinase K Stamm Lösung sowie 200 µl AL Puffer. Dem 15 sek. Mischen mit dem Vortex folgte eine 10 min. Inkubation bei 70° C.

Nach Zugabe von 210 µl Ethanol (96%) und erneutem Mischen wurde die Probe in eine Filtersäule überführt, die mit einem Auffanggefäß kombiniert war. Es schloss sich eine 1 min. Zentrifugation bei 8000 U/min an und nach Auffangbehälterwechsel und Zugabe von 500 µl AW Puffer wurde erneut 1 min. bei 8000 U/min zentrifugiert.

Der wiederholten Zugabe von 500 µl AW Puffer folgte eine 3 min. Zentrifugation bei 13000 U/min. Zur Elution der DNA wurde anschließend nach Auffanggefäßwechsel 200 µl AE Puffer, der auf 70° C erhitzt worden war, hinzugefügt und nochmals bei 8000 U/min zentrifugiert. Die DNA befand sich jetzt im Auffanggefäß und war zum Einbringen in die Elektrophorese bereit.

2.4.2.2. Agarose – Gel

Die Agarose wurde entsprechend der gewünschten Gel - Konzentration abgewogen, zu TBE Puffer (1x) hinzugefügt und auf ca. 100° C erhitzt.

Nach Ausklaren der Lösung und Abkühlen auf ca. 50° C wurde Ethidiumbromid hinzugegeben (5 µl / 100 ml Gel) und mit dem Rührer suspendiert.

Anschließend wurde das Gel gegossen und nach Abkühlen die DNA eingebracht.

Hierzu wurden 20 µl des Eluats mit 5 µl „loading Buffer“ vermischt und in die Geltasche eingebracht.

Zum Vergleich wurde zusätzlich in eine Bahn ein 100 bp Standard eingebracht, außerdem wurde eine Bahn mit Aqua dest. gefüllt.

Die DNA wurde im 1,8 % Gel bei 80 V über einen Zeitraum von 2 – 3 Stunden getrennt.

Die Auswertung erfolgte über einem UV- Lichtschirm mit Kamera, der das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid anregte und somit die DNA - Banden sichtbar machte.

Die Banden wurden zur Dokumentation fotografiert.

2.4.3. TUNEL - Test

2.4.3.1 TUNEL – Test an Zellkulturen

Die Induktion der Apoptose wurde mit den Agenzien, entsprechend der in den Protokollen angegebenen Konzentrationen (s. S. 21 – 22) und Zeiten durchgeführt. Die TUNEL – Färbung erfolgte in mehreren Schritten.

Adhärent wachsende Zellen wurden in der Kulturflasche zweifach mit je 10 ml PBS abgespült, danach für 10 min. mit 5 ml Trypsin - EDTA inkubiert.

Die so abgelösten und in Suspension vorliegenden Zellen sowie die nicht adhärent wachsenden Zell - Linien wurden bei 800 U/min für 6 min. zentrifugiert, in 20 ml PBS resuspendiert und erneut für 6 min bei 800 U/min zentrifugiert.

Das so entstandene Pellet wurde in Formalinlösung (2 %) resuspendiert und so für 10 min. fixiert.

Vor dem Aufbringen auf die Objektträger wurden die Zellen zentrifugiert und erneut in 20 ml PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Durch entsprechende Verdünnung wurden die Zellen in einer Konzentration von zirka 1000 Zellen / 20 µl als Spot auf die Objektträger aufgebracht. Nach Trocknen bei 37° C wurden die Proben dem TUNEL - Test zugeführt.

Die einzeln aufgetragenen Zellsedimente wurden auf dem Objektträger jeweils mit einem Fettstift umrandet und so gegeneinander abgegrenzt, um ein Vermischen der unterschiedlichen Reagenzien zu vermeiden.

Die vorbereiteten Objektträger wurden 5 min. in PBS gewaschen, d. h. in einer Küvette mit PBS übergossen und auf einem Rüttler ständig in Bewegung gehalten. Es folgte die Überdeckung der Objektträger mit Permeabilisierungs - Lösung (0,1 % Triton in 0,1 % Natriumzitat) für 2 min. auf Eis. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und der Objektträger für 10 min. mit PBS in einer Küvette gewaschen.

Die Positivkontrolle wurde durch Inkubation mit DNase I hergestellt. Das Enzym wurde in eine Aktivität von 1 U / ml in PBS (1x) aliquotiert und für 15 min. auf

die Zellspots aufgebracht. Anschließend wurde zweimal in PBS gewaschen, und die TUNEL – Färbung wie folgt durchgeführt.

Der Test - Kit wird frisch aufgetaut. Nach Entnahme von 100 µl aus der „label solution“ wird der Rest mit der Enzymlösung gemischt und je 10 µl pro Spot aufgebracht. Ein Spot wurde mit der entnommenen „label solution“ (ebenfalls 10 µl) inkubiert, die ohne Enzym als Reagenzienkontrolle diente.

Nach Abdeckung mit Deckgläschen verlief die Reaktion in einer 37° C warmen, feuchten Kammer für 30 min. Nach diesem Schritt wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger kurz in PBS abgespült.

Es schlossen sich drei, je 10 minütige Waschschrte an, wobei der erste in PBS erfolgte, dem 2 % FBS zugegeben war. Der zweite und dritte Schritt wurde mit PBS ohne FBS Zusatz durchgeführt.

Durch Saugpapier wurden die Objektträger von überstehendem PBS befreit und die einzelnen Spots mit je 15 µl „converter POD“ bedeckt. Es folgte erneut die Abdeckung mit einem Deckglas und 30 min. Inkubation bei 37° C in der feuchten Kammer.

Nach Deckgläschenentfernung schlossen sich erneut drei Waschschrte an (1x PBS + FBS 2 %, 2x PBS).

Während dieser Schritte erfolgte der Ansatz des Peroxidasesubstrates, indem 1 ml Reaktionspuffer mit 7 ml Aqua ad inject. verdünnt wurde; nach Zugabe von 4 Tropfen Aminoethylcarbazol wurde gut vermischt. Mit diesem Substrat wurden die einzelnen Spots nach „Abtrocknen“ überschichtet und bei 37° C für 15 min. inkubiert.

Es folgten zwei Spülschrte mit PBS für je 10 min. und eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Hierzu wurden die Objektträger für 2 min. in ein Färbebad eingelegt und nach leichtem Abspülen für 10 min. in PBS belassen.

Im Anschluss folgte das Eindecken der Präparate mit Gelatine und die lichtmikroskopische Beurteilung.

2.4.3.2 TUNEL – Test und EN 4 - Färbung an Myokardbiopsien

Die Schnitte der Myokardbiopsien für den TUNEL – Test wurden in eiskaltem Azeton für 10 min. fixiert. Anschließend wurden sie für 10 min. in PBS (1x) eingelegt, um Reste des Fixierungsmittels zu entfernen.

Für jeden Patienten lag ein Objektträger mit acht Schnitten seiner Biopsien vor. Die Biopsien wurden mit Fettstift markiert und somit gegeneinander abgegrenzt. Es folgte die Überdeckung der Objektträger mit Permeabilisierungs - Lösung (0,1 % Triton in 0,1 % Natriumzitat) für 2 min. auf Eis.

Danach wurden die Träger in PBS kurz abgespült und anschließend 10 min. in PBS gewaschen.

Jetzt wurde die „Positivkontrolle“ hergestellt, dies erfolgte analog der Zellversuche mit DNase I in einer Aktivität von 1 U / ml. Das Enzym wurde auf die Biopsien aufgebracht und für 15 min. bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen.

Nach dem Abtupfen überschüssiger PBS Lösung erfolgte die TUNEL - Färbung. Hierzu wird der Testkit frisch aufgetaut und 100 µl „label solution“ werden entnommen, bevor der Rest mit der Enzymlösung vermischt wird. Die zwei äußeren Felder des Objektträgers dienten als Reagenzienleerwert und wurden nur mit „label solution“ ohne Enzymlösung inkubiert, ansonsten war die Behandlung identisch mit den anderen Proben.

Die einzelnen Biopsien wurden jetzt mit je 20 µl Enzymlösung bzw. „label solution“ für den Reagenzienleerwert überschichtet, mit einem Deckglas bedeckt und bei 37° C in einer feuchten Kammer für 60 min. in Dunkelheit inkubiert. Der Entfernung des Deckgläschens schlossen sich drei Waschschrte an, die jeweils für 10 min. im Dunkeln durchgeführt wurden. Der erste Schritt in PBS mit 2 % FBS. Der zweite und dritte Schritt je in PBS (1x) ohne Zusatz.

Nach Entfernen von überständigem PBS durch Saugpapier folgte eine 30 - minütige Inkubation mit „converter POD“ ebenfalls mit einem Deckglas im Dunkeln bei 37° C.

Anschließend wurde das Deckgläschen entfernt und drei Waschschrte wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Herstellung des POD - Substrats gelingt durch Zugabe von 1 ml Reaktionspuffer zu 7 ml aqua ad inject. und Zugabe von 4 Tropfen Aminoethylcarbazol.

Nach gründlichem Mischen der Substratlösung und erneutem „Trocknen“ der Biopsien wurden diese mit der Lösung überschichtet und 10 min. bei 37° C im Dunkeln inkubiert.

Jetzt erfolgte eine Zusatzfärbung mit einem Antikörper gegen das Membranprotein EN 4, das in allen menschlichen Endothelzellen exprimiert wird.

Dieser Färbeschritt erleichtert die Unterscheidung zwischen Myokardzellen und Endothelzellen der Kapillaren.

Hierzu wurde der AK (Maus IgG) 1 : 100 mit PBS (1x) verdünnt und 1 Tropfen auf jede Biopsie aufgebracht, so dass sie vollständig bedeckt war. Die Inkubation erfolgte über 40 min. bei Raumtemperatur.

Der Objektträger wurde nun mit PBS abgespült und in frischem PBS für 20 min. auf dem Rüttler gewaschen. Der Ansatz der Anti - IgG Lösung erfolgte durch Zugabe von 3 Tropfen Normalserum und 1 Tropfen „biotin label“ AK zu 10 ml PBS.

Hiermit wurde die Biopsie erneut nach „Absaugen“ des überschüssigen PBS, mit 1 Tropfen bedeckt und für 15 min. inkubiert. Die anschließenden Waschschrte erfolgten wie oben beschrieben. Zur Herstellung der „ABC - reagent“ wurden 5 ml PBS mit je 1 Tropfen der Fläschchen A und B vermischt. Es schloss sich eine erneute Inkubation analog der Anti - IgG Inkubation an (1 Tropfen / 15 min.). Nach dem Waschen, welches in bekannter Weise erfolgte, wurde der „alkaline substrate kit“ verwendet. Es wurden zu 5 ml HCl Puffer je 2 Tropfen aus den Flaschen 1 – 3 hinzugegeben, nachdem diese zuvor gründlich geschüttelt wurden.

Die Biopsien wurden mit je einem Tropfen Lösung bedeckt und für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Reaktion wurden die Objektträger zweifach in PBS (1x) gewaschen (je 10 min. auf dem Rüttler) und mit Hämatoxylin gefärbt. Sie wurden hierzu für 45 sek. in ein Färbebad eingelegt, kurz abgespült und für weitere 10 min. in PBS (1x) eingelegt.

Es folgte das Eindecken der Objektträger in Gelatine.

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch durch zwei Untersucher, unabhängig voneinander. Die erzielten Ergebnisse wurden zur Auswertung gemittelt.

Auswertung:

Es wurden die positiv gefärbten Zellkerne zum Einen in Relation zur Gesamtzellkernzahl gesetzt, zum Anderen auf die untersuchte Fläche in mm^2 bezogen.

Fibrozyten wurden anhand ihrer Morphologie, Endothelzellen durch die EN 4 Zusatzfärbung vom Myozyten differenziert und nicht gezählt. Positiv gefärbte Zellkerne im Randbereich der Biopsie wurden nicht ausgewertet, da es sich hier um artifizielle Anfärbung handeln könnte.

2.5. Zellfixierung

Für die Zellfixierung, die für den TUNEL – Test notwendig ist, stehen mehrere Methoden zur Auswahl (Negoescu et al., 1996). Diese wurden am Zellsystem der HL – 60 Zellen bezüglich ihrer Einflussnahme auf die Färbung verglichen.

Folgende Möglichkeiten wurden verglichen:

- 1) Fixierung in Azeton, (- 30° C) für 10 min.
- 2) Fixierung in Methanol, (- 30° C) für 10 min.
- 3) Fixierung in Formalin 4 %

Durchführung:

- 1) und 2)
 - Auftropfen der Zellsuspension auf den Objektträger in gewünschter Zelldichte
 - Trocknung bei 37° C
 - Einlegen in Azeton bzw. Methanol (- 30° C) für 10 min.
 - Entnehmen des Objektträgers und Lufttrocknung
 - Waschen in PBS (1x)
- 3)
 - Auftropfen der Zellsuspension auf den Objektträger in gewünschter Zelldichte
 - Trocknung bei 37° C
 - Einlegen in Formalinlösung (4 %)
 - Entnehmen des Objektträgers und Lufttrocknung
 - Waschen in PBS (1x)

2.6. Statistik

TUNEL Test:

Inter- und Intraassayvarianz: Diese wurden anhand der Zellversuche ermittelt. Hierzu diente eine Probe die mit Etoposid (80 µg / ml) für 2 Stunden inkubiert war und direkt im Anschluss ausgewertet wurde.

Zur Bestimmung der Intraassayvarianz wurden vier Proben aus dem o. g. Ansatz entnommen und nacheinander ausgewertet.

Bei einem Mittelwert TUNEL - positiver Zellen von 9,33 %, ergab sich eine Varianz von 0.31.

Die Ermittlung der Interassayvarianz erfolgte anhand von vier parallel durchgeführter Versuche. Die Zellen wurden hierfür ebenfalls mit Etoposid (s. o.) behandelt. Aus jedem der vier Versuchsansätze wurden je vier Proben entnommen. Die Ergebnisse der einzelnen Proben wurden gemittelt und aus den so erhaltenen vier Werten die Varianz errechnet.

Hier wurde ein Wert von 0,1 ermittelt.

Auswertung Endomyokardbiopsien:

Die Auswertung der Myokardbiopsien erfolgte durch zwei Untersucher, die die Biopsien unabhängig voneinander beurteilten. Die Gruppenzugehörigkeit der Biopsie war unbekannt.

Insgesamt wurden die Proben von jedem Untersucher zweifach ausgewertet.

Die im Ergebnisstil angegebenen Werte entsprechen den gebildeten Mittelwerten.

Zur Bestimmung der Interobservervarianz wurden die entsprechenden Werte der einzelnen Untersucher miteinander verglichen. Zu jedem Wertpaar wurde die Varianz bestimmt und aus den resultierenden 67 Einzelvarianzen der Mittelwert bestimmt.

Dieser betrug 0,01.

Ergebnisse Endomyokardbiopsien:

Die Normalverteilung wurde durch den Kolmogoroff - Smirnov - Test

überprüft. Die Gleichheit der Varianz mittels Levene - Test bestimmt.

Der Vergleich der einzelnen Gruppen wurde durch den „Duncan multiple range“ - Test durchgeführt, hierbei wurde $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

Zur gruppeninternen Auswertung wurden die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (S.E.) angegeben.

3. Ergebnisse

Es wurden an den Zelllinien „HL–60“ und „humanen Fibroblasten“ mit verschiedenen Agenzien Induktionsversuche durchgeführt. Apoptose wurde durch DNA – laddering qualitativ, und durch den TUNEL - Test und die Annexin / Propidiumjodid - Färbung quantitativ ausgewertet, wobei letzteres mit Durchflusszytometrie bestimmt wurde.

Nach der Etablierung der Methoden wurden Myokardbiopsien von Patienten mit verschiedenen Herzmuskelerkrankungen mittels TUNEL - Test und EN 4 - Färbung auf Apoptose untersucht und ausgewertet.

3.1. Ergebnisse der Zellkulturversuche

3.1.1. Induktion der Apoptose an Fibroblasten

In den Versuchen mit Fibroblasten ließ sich in keiner der beschriebenen Konstellationen (s. 2.3) Apoptose nachweisen.

Es zeigte sich auf die Induktionsversuche lediglich eine temporäre Stagnation im Wachstum.

3.1.2. Induktion der Apoptose an HL – 60 Zellen

Bei HL–60 Zellen ließ sich durch die Inkubation mit verschiedenen Agenzien Apoptose induzieren.

3.1.2.1. Auswertung der Annexin / Propidiumjodid - Färbungen

In der Annexin / Propidiumjodid - Färbung, die mit der Durchflusszytometrie ausgewertet wurde, ergaben sich die folgenden Ergebnisse. Die verschiedenen Färbekombinationen sind wie folgt zu interpretieren.

Annexin / Propidiumjodid:

negativ / negativ: vitale Zelle

negativ / positiv: nekrotische Zelle

positiv / negativ: apoptotische Zelle

positiv / positiv: nekrotische Zelle

Inkubation der Zellen mit 80 µg / ml Etoposid für 2 Stunden :

Nachinkubationszeit (Stunden)	0	4	12	16	22
Annexin / Propidiumjodid - Färbung	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)
negativ / negativ	65,3	54,8	29,8	24,3	12,3
negativ / positiv	0,2	0,1	0,2	0,4	0,5
positiv / negativ	11,9	41,5	47,9	40,9	57,3
positiv / positiv	22,6	3,7	22,1	34,4	29,9
ausgewertete Zellen (gesamt)	27767	43642	34586	35579	28489

Tabelle 3.1: Ergebnisse Zellinkubation mit Etoposid für 2 Stunden

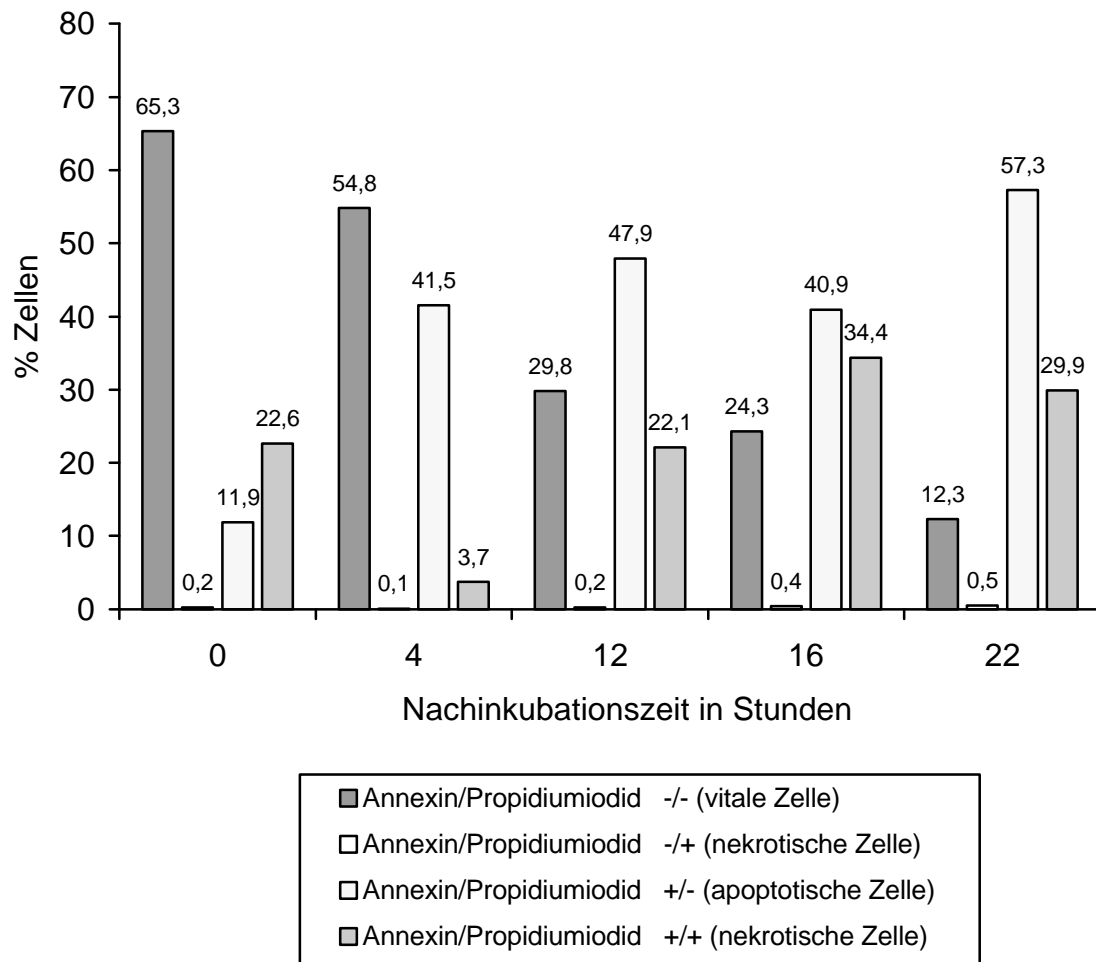


Abbildung 3.1: Ergebnisse Zellinkubation mit Etoposid für 2 Stunden

Die Rate der apoptotischen Zellen stieg im Verlauf des Versuchs von 11,9 % zu Beginn, auf das Maximum von 57,3 % nach 22 Stunden Nachinkubationsdauer. Der Anteil der nekrotischen Zellen stieg von anfangs 22,6 % auf den Höchstwert von 34,4 % nach 16 Stunden an, wobei ein niedriger Wert von 3,7 % nach 4 Stunden auffällt (Tab. 3.1, Abb. 3.1).

Die Versuche in denen die Zellen für 15 min. mit UV – Licht bestrahlt wurden zeigten folgende Ergebnisse:

Nachinkubation Zeit / Stunden	t=0	t=4	t=12	t=16	t=22
Annexin / Propidiumiodid - Färbung	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)
negativ / negativ	76,2	34,3	0,8	0,8	1,4
negativ / positiv	0,0	0,2	0,1	0,3	0,3
positiv / negativ	9,0	53,4	72,2	56,2	56,2
positiv / positiv	14,8	12	26,9	42,7	42,2
ausgewertete Zellen (gesamt)	24522	44613	35966	39766	25357

Tabelle 3.2: Ergebnisse Zellbestrahlung mit UV – Licht für 15 min.

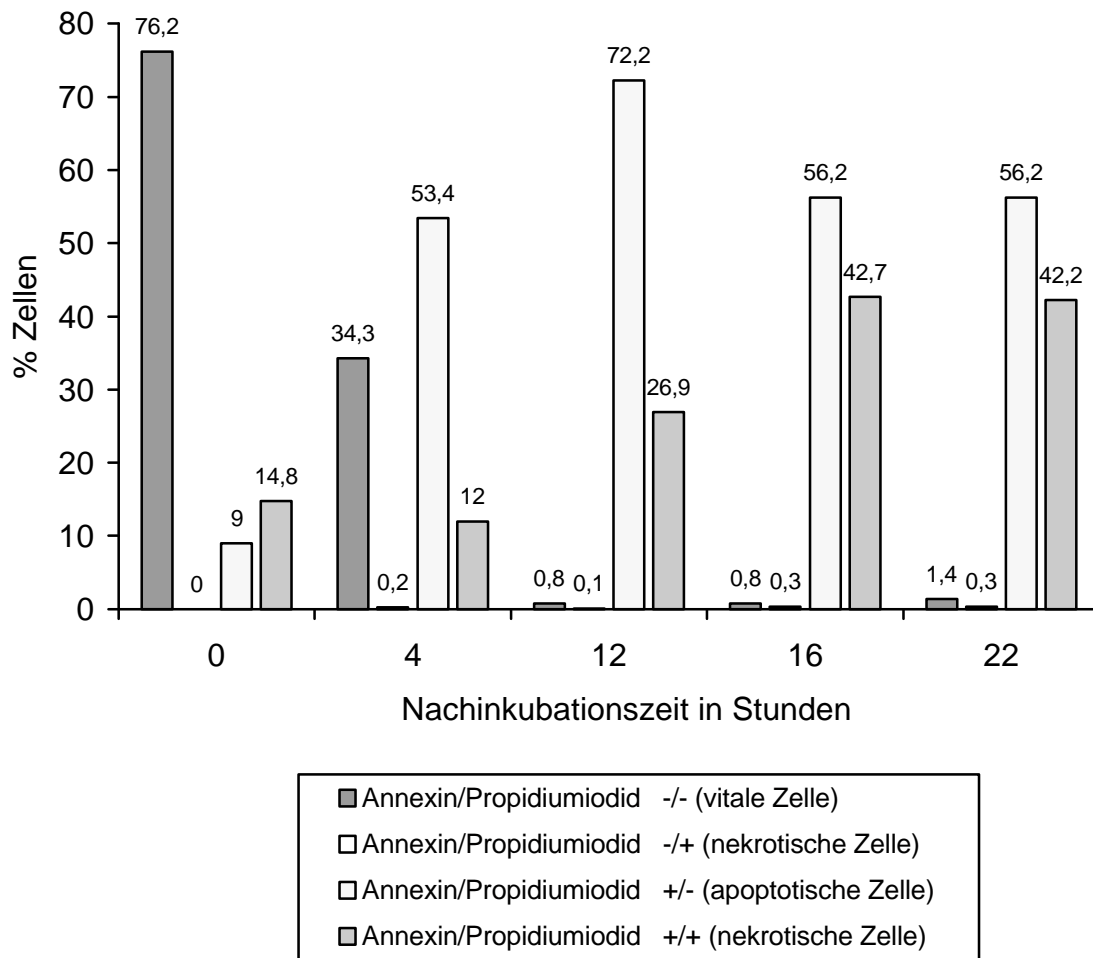


Abbildung 3.2: Ergebnisse Zellbestrahlung mit UV – Licht für 15 min.

In der Population, die der UV – Strahlung ausgesetzt war, zeigte sich eine wesentlich schnellere Veränderung der Zellzustände. Das Maximum an apoptotischen Zellen wurde hier bereits nach 12 Stunden mit 72,2 % erreicht. Der Höchstwert an nekrotischen Zellen zeigte sich hier nach 16 Stunden mit 42,7 %. Ein Abfallen der Normalpopulation auf unter 2 % fand sich bereits nach 12 Stunden (Tab. 3.2, Abb. 3.2).

Die Auswertung der Kontrollpopulation zeigt Tabelle 3.3:

Nachinkubation Zeit / Stunden	t=0	t=4	t=12	t=16	t=22
Annexin / Propidiumiodid -Färbung	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)
negativ / negativ	84,2	87,4	92,4	91,1	86,7
negativ / positiv	0,2	0,1	0,1	0,4	0,1
positiv / negativ	4,6	7,9	5,5	3,3	7,7
positiv / positiv	11,0	4,6	2,1	5,3	5,5
ausgewertete Zellen (gesamt)	8399	32134	55951	65443	24322

Tabelle 3.3: Ergebnisse Kontrollpopulation

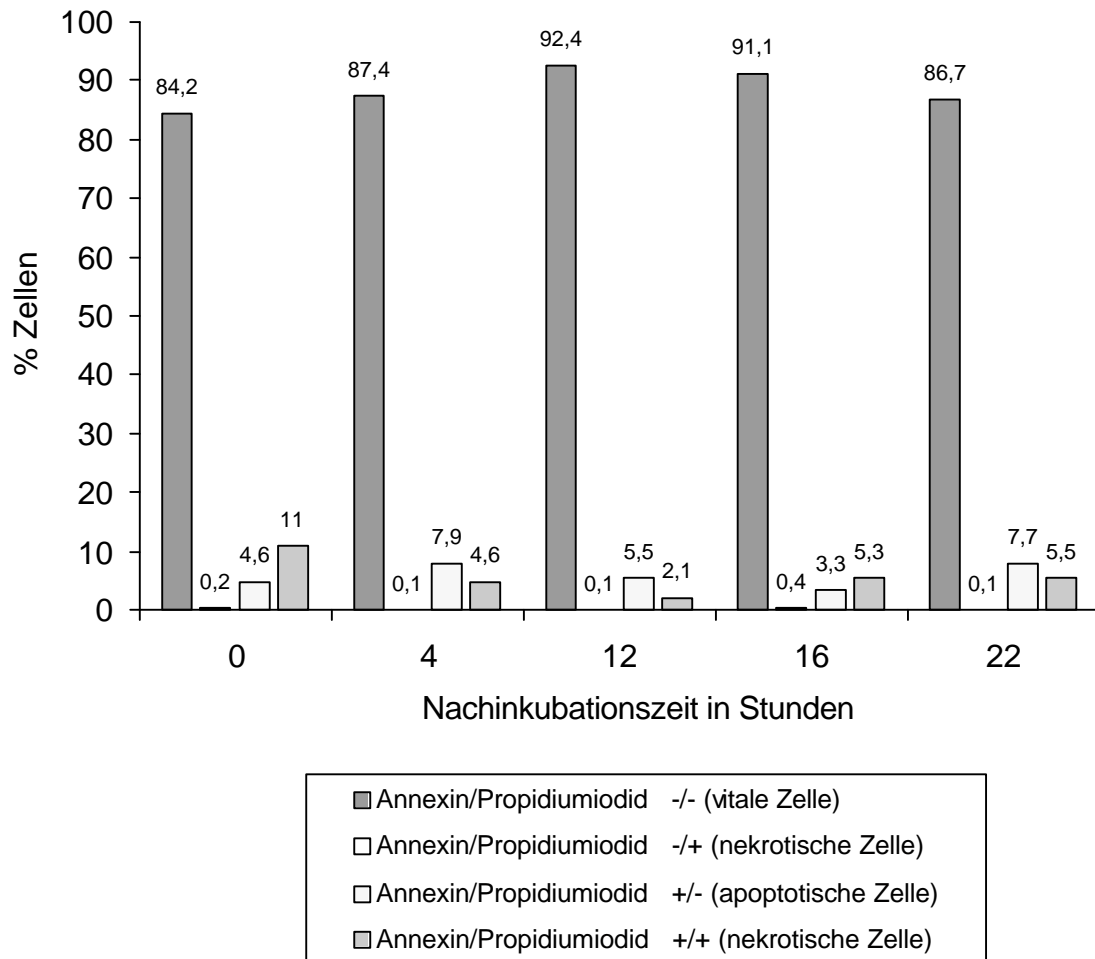


Abbildung 3.3: Ergebnisse Kontrollpopulation

In der Gruppe der unbehandelten Zellen zeigten sich über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstante Populationsverhältnisse (Tab. 3.3, Abb. 3.3).

Anhand der HL - 60 Zellen, die als Nekrosekontrolle dienten (80° C / 15 min.), konnten die in Tabelle 3.4. zusammengefassten Werte ermittelt werden.

Nachinkubation Zeit / Stunden	t=0	t=4	t=12	t=16	t=22
Annexin / Propidiumiodid -Färbung	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)	Zellen (%)
negativ / negativ	0,2	0,5	0,4	0,4	1,1
negativ / positiv	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2
positiv / negativ	22,6	24,1	1,1	1,6	9,9
positiv / positiv	77,1	75,4	98,4	98,0	88,8
ausgewertete Zellen (gesamt)	46349	25174	37105	52302	19258

Tabelle 3.4: Ergebnisse Nekrosekontrolle

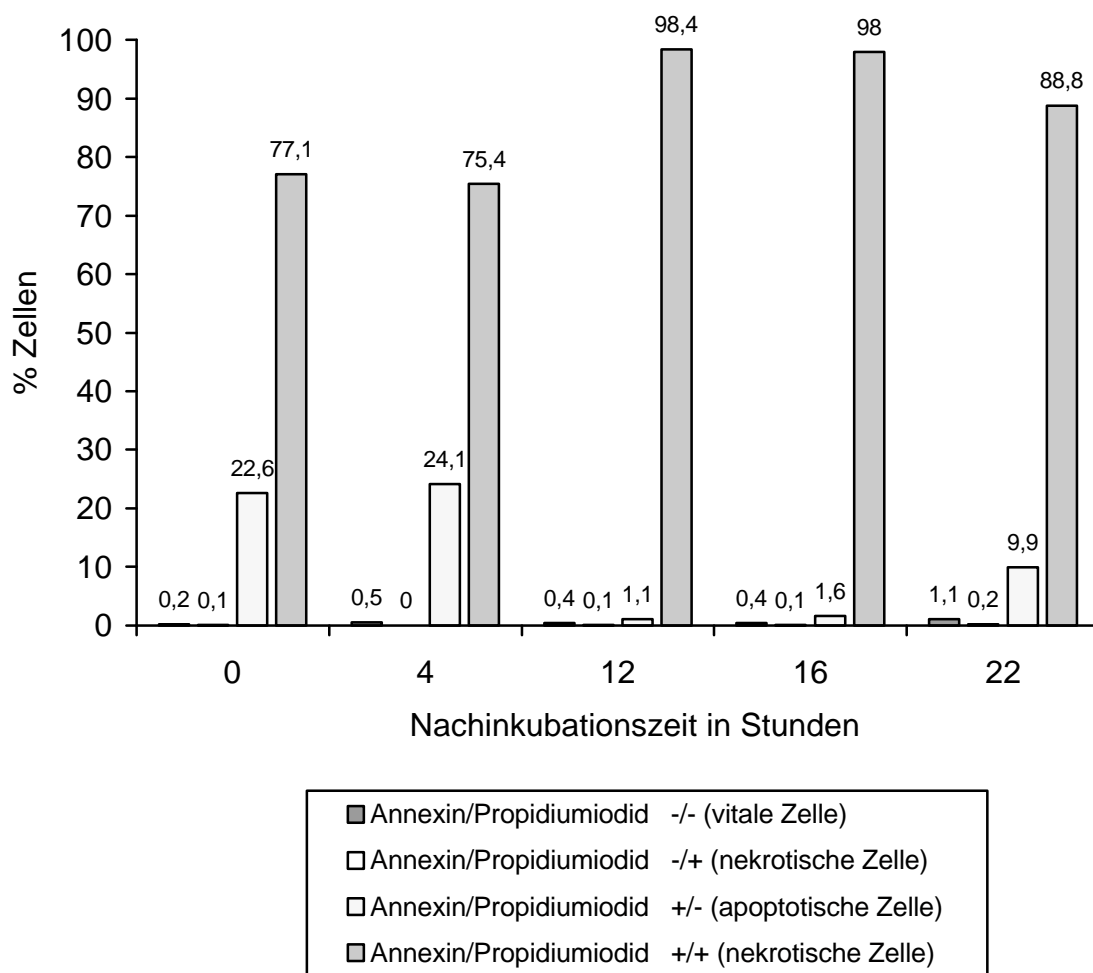


Abbildung 3.4: Ergebnisse Nekrosekontrolle

Die Nekrosekontrolle, in der die Zellen über einen Zeitraum von 15 min. einer Temperatur von ca. 80° C ausgesetzt waren, zeigten erwartungsgemäß einen hohen Nekroseanteil, der sich nach 12 h Nachinkubation auf über 98 % steigerte (Tab. 3.4, Abb. 3.4).

3.1.2.2. Auswertung des TUNEL - Tests

Zur Durchführung des TUNEL – Test wurden die Zellen fixiert.

Hierzu wurden Vergleichsfixierungen angefertigt. Die Fixierung mit Formalin erbrachte hierbei die qualitativ besten Ergebnisse. Quantitativ zeigten sich identische Ergebnisse.

Aus diesem Grund wurden die anschließenden Versuche mit Formalin - fixierten Zellen durchgeführt.

Für die Apoptosebestimmung mittels TUNEL – Test wurden die Zellen entsprechend der Inkubationsprotokolle behandelt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Die folgende Ergebnisse ergaben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung, d. h. es wurden zwei Proben aus derselben Kulturflasche entnommen und ausgewertet.

Für die Inkubation der Zellen mit 80 µg Etoposid / ml für 2 Stunden zeigten sich diese Werte:

Nachinkubation Zeit / Stunden	0	4	12	16	22	26
apoptotische Zellen %	9,13	35,4	46,75	52	43,8	1
SD	0,80	0,85	1,06	1,41	2,96	1,13

Tabelle 3.5: Ergebnisse Zellinkubation mit Etoposid für 2 Stunden;

SD: Standardabweichung

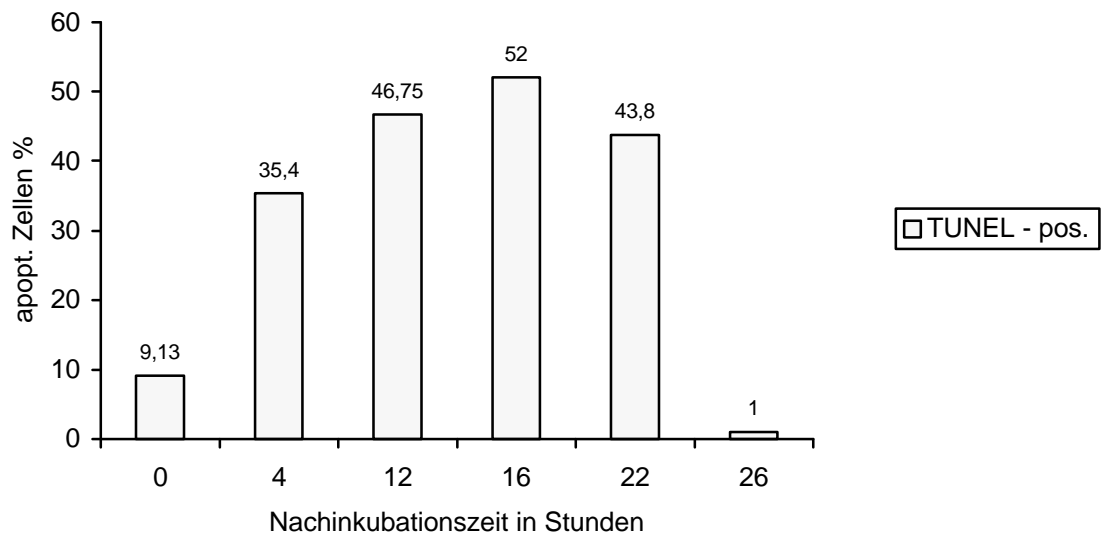


Abbildung 3.5: Ergebnisse Zellinkubation mit Etoposid für 2 Stunden

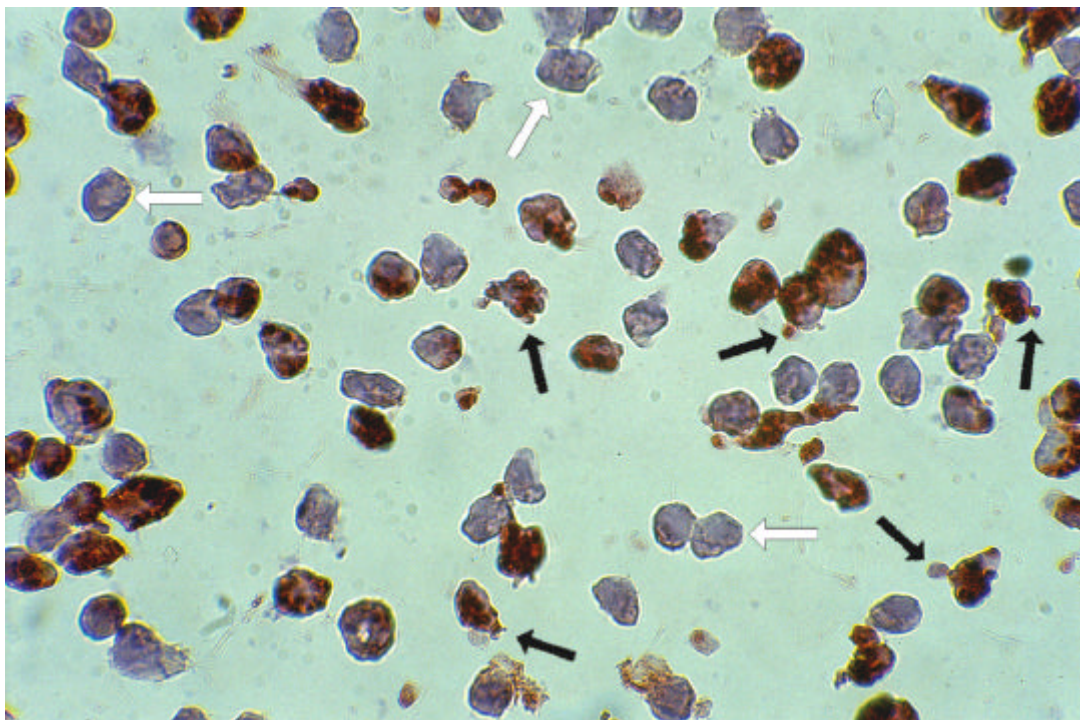


Abbildung 3.6.: HL- 60 Zellen, 2 Stunden mit Etoposid (80 µg/ml) inkubiert, anschließend 12 Stunden Nachinkubation. Durch die schwarzen Pfeile sind die Apoptosekörperchen markiert, die weißen Pfeile weisen auf vitale Zellen.

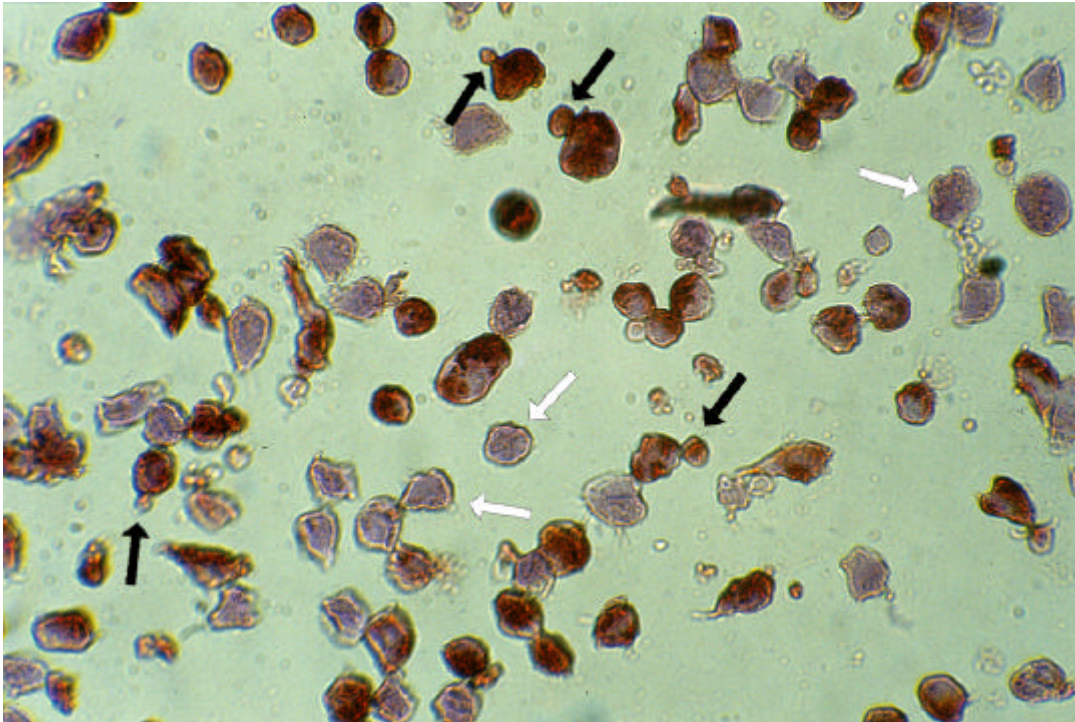


Abbildung 3.7.: HL- 60 Zellen, 2 Stunden mit Etoposid (80 µg/ml) inkubiert, anschließend 16 Stunden Nachinkubation. Durch die schwarzen Pfeile sind die Apoptosekörperchen markiert, die weißen Pfeile weisen auf vitale Zellen.

Es ist ein kontinuierlicher Anstieg der TUNEL – Test positiven Zellen zu erkennen. Das Maximum wird nach etwa 16 Stunden Nachinkubationszeit erreicht, danach folgt ein schneller Abfall. Nach 26 Stunden waren nur noch Zellreste erkennbar.

In der Zellpopulation, die für 15 min. mit UV – Licht bestrahlt wurden, konnten folgende Werte ermittelt werden:

Nachinkubation Zeit / Stunden	0	4	12	16	22	26
apoptotische Zellen %	26,4	39,55	34,8	42,7	42,6	4,75
SD	0,57	0,78	0,28	3,82	2,26	1,06

Tabelle 3.6: Ergebnisse Zellbestrahlung mit UV – Licht für 15 min

SD: Standardabweichung

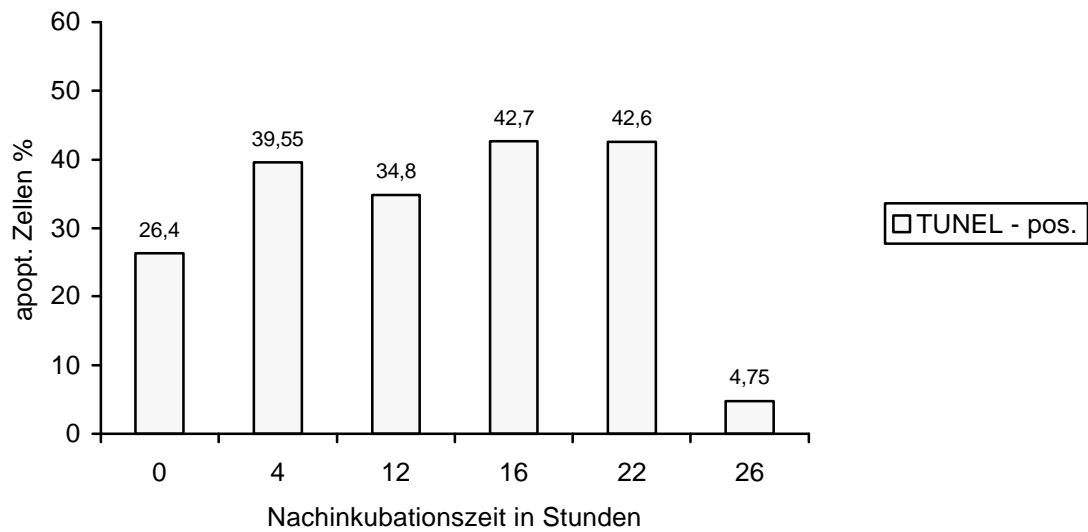


Abbildung 3.8: Ergebnisse Zellbestrahlung mit UV – Licht für 15 min

Auch diese Versuchsreihe zeigte eine zunehmende Zahl TUNEL – Test positiven Zellen mit steigender Nachinkubationsdauer. Das Maximum wurde nach etwa 16 Stunden erreicht. Nach 22 Stunden fiel die Apoptoserate stark ab, so dass bei einer Nachinkubationszeit von 26 Stunden nur noch wenige Zellen zu erkennen waren.

In der unbehandelten Kontrollpopulation ergaben sich diese Werte:

Nachinkubation Zeit / Stunden	0	4	12	16	22	26
apoptotische Zellen %	1,5	3,8	3,2	3,3	4,8	5
SD	0,71	0,42	0,28	0,42	1,13	1,41

Tabelle 3.7: Ergebnisse Kontrollpopulation

SD: Standardabweichung

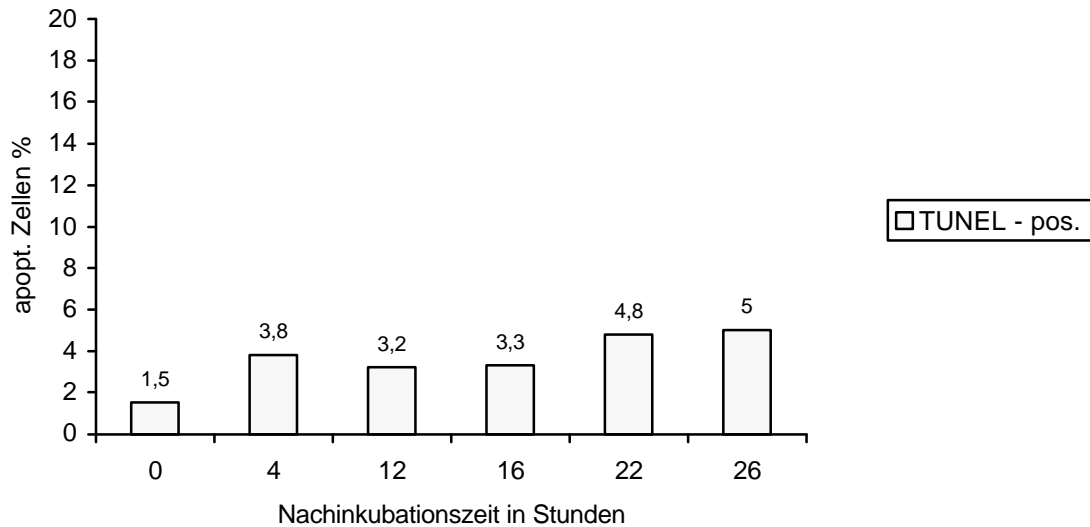


Abbildung 3.9: Ergebnisse Kontrollpopulation

In der Versuchsreihe der Kontrollpopulation zeigte sich geringer Anteil von apoptotischen Zellen, sie machten hier maximal 5% aller Zellen aus.

Die Zellen die mit DNase I behandelt worden waren und als Positivkontrollen dienten erbrachten folgende Werte:

Nachinkubation Zeit / Stunden	0	4	12	16	22	26
apoptotische Zellen %	95,7	96	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
SD	1,84	1,41	-	-	-	-

Tabelle 3.8: Ergebnisse DNase I für 15min.; n.a.: nicht auswertbar

Bereits direkt nach der Inkubation von 15 min. Dauer machten die TUNEL - positiven Zellen einen Prozentsatz von 95,7 aus.

Nach einem Zeitraum von 12 h waren lediglich noch Zelltrümmer nachweisbar.

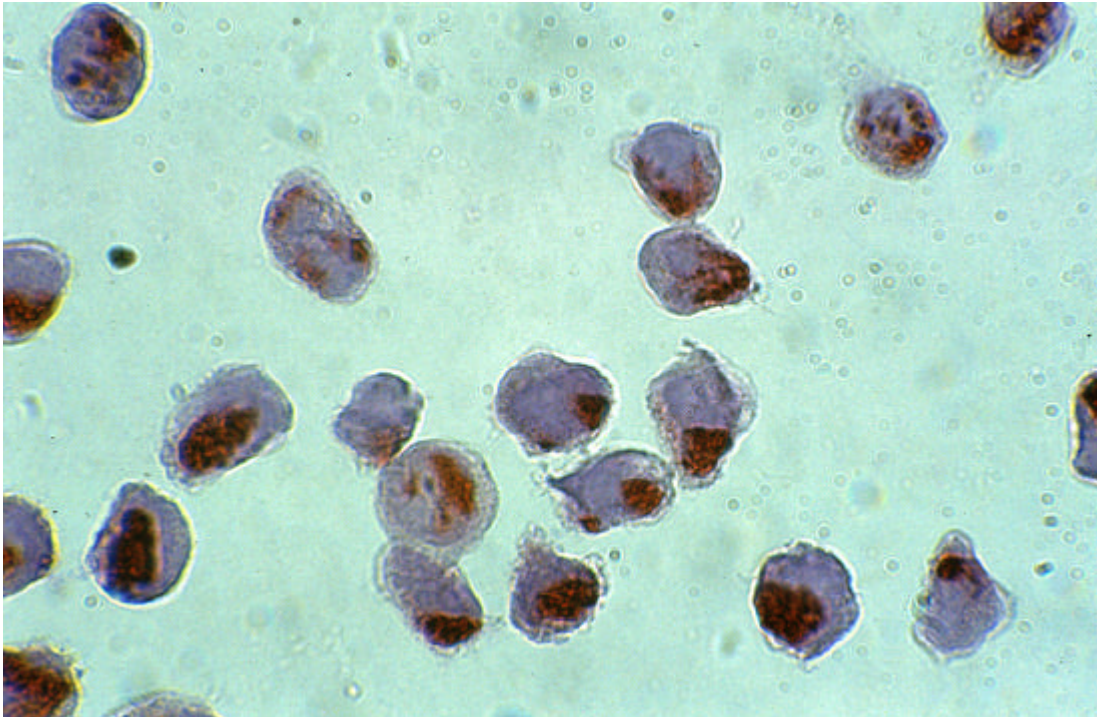


Abbildung 3.10: HL-60 Zellen zur Positivkontrolle mit DNase I (1 U/ml) für 15 min. bei 37° C inkubiert. Deutlich ist die Braunfärbung der Kerne als Zeichen von fragmentierter DNA erkennbar.

3.1.2.3. Auswertung des DNA - ladderings

Der Apoptosenachweis mit Hilfe des DNA - ladderings zeigte nach der Gel – Elektrophorese (1,8 % Gel bei 80 V, 2 Stunden Laufzeit) die für die Apoptose typische „Banden – Leitern“ in den Spuren 3 – 6. In der Spur Nr. 7 ist deutlich der für Nekrose typische „DNA – smear“ erkennbar.

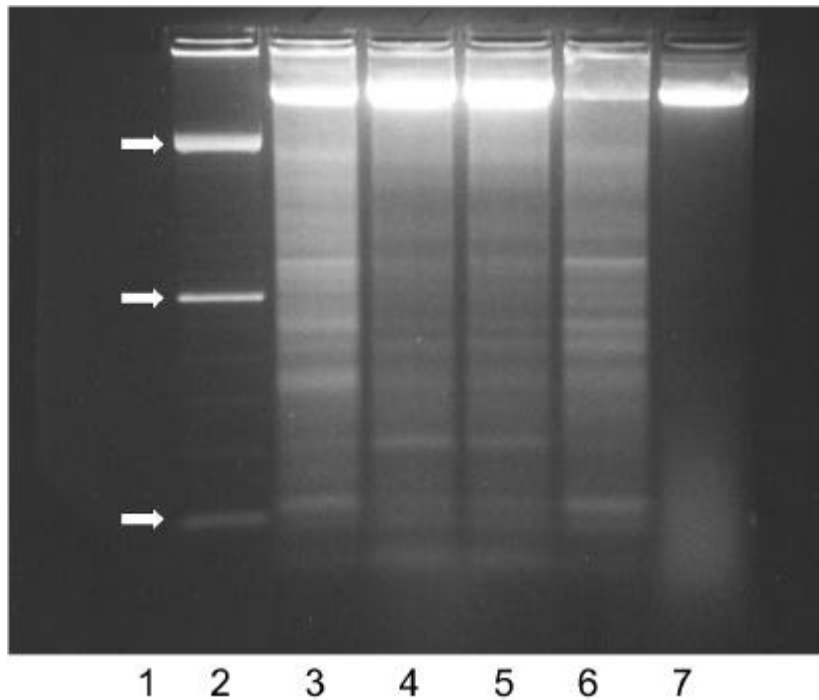


Abbildung 3.11: DNA - laddering der HL-60 Zellen

Die Auftragung entspricht folgenden Agenzien:

Spur 1 : Aqua dest.

Spur 2 : Standard 100 bp; die drei markierten deutlichen Banden liegen bei 1500 bp, 600 bp und 100 bp.

Spur 3 : Etoposid (80 µg / ml für 2h, 4h Nachinkubation)

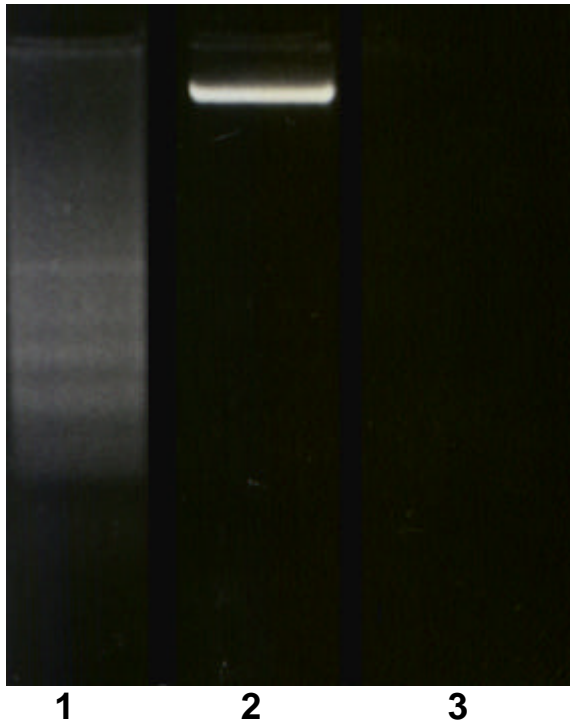
Spur 4 : CPT 11 (5 µg / ml für 1h, 4h Nachinkubation)

Spur 5 : CPT 11 (2 µg / ml für 1h, 4h Nachinkubation)

Spur 6 : Etoposid (40 µg / ml für 2h, 4h Nachinkubation)

Spur 7 : Nekrosekontrolle (15 min bei 80° C)

Das DNA – laddering mit UV bestrahlten Zellen zeigt auf der Spur, auf die die DNA der bestrahlten Zellen aufgetragen wurde, das typische Leitemuster.



Spur 1: UV Bestrahlung 15 min.;
4 h Nachinkubation

Spur 2 : Kontrolle (unbehandelte
Zellen)

Spur 3: Aqua dest.

Abbildung 3.12: DNA – laddering der HL –60 Zellen

3.2. Ergebnisse Endomyokardbiopsien

Die lichtmikroskopische Auswertung der Biopsien erfolgte durch zwei Untersucher.

Die Auswertung der Myokardbiopsien zeigte im Falle der akuten Myokarditis die höchste Rate an apoptotischen Zellen mit 6,15 %.

Eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$; s. 2.6) zeigte sich in der Gruppe der chronischen Myokarditis.

Hier fand sich eine Quote von durchschnittlich 1,06 %, bei doch erheblicher Streubreite und einem Median von 0,09 %.

Die dilatativen Kardiomyopathien mit Nachweis einer Entzündungsreaktion besaßen einen Apoptoseindex von 0,11 %.

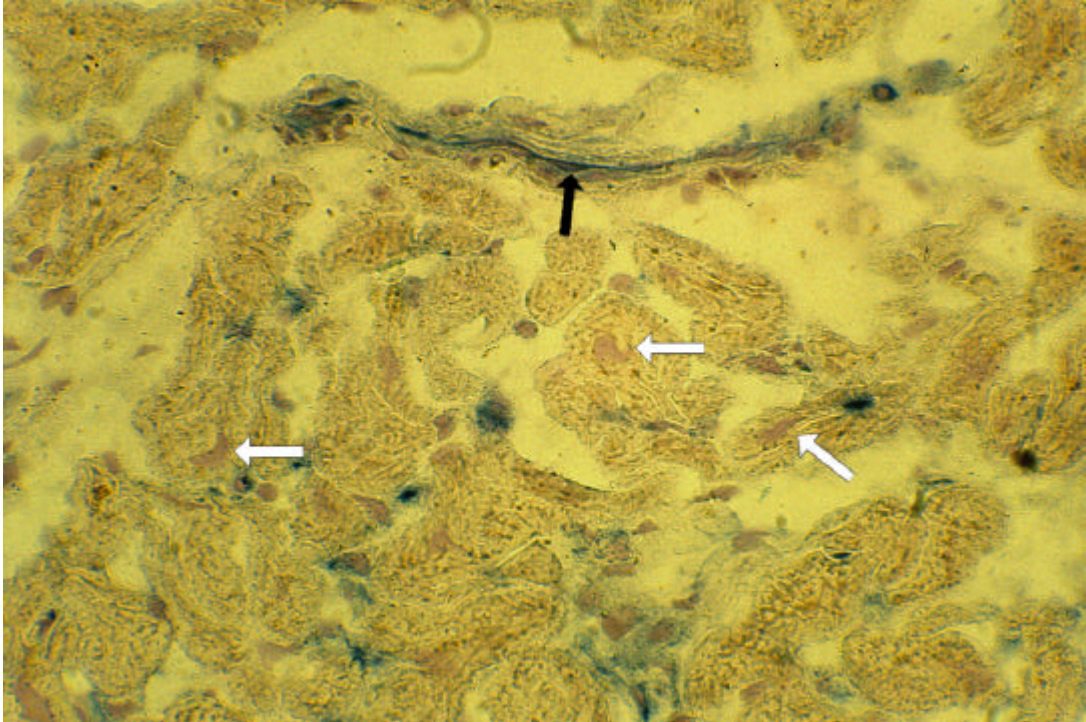


Abbildung 3.13: Myokardbiopsie bei DCMi. Mit dem schwarzen Pfeil markiert ein längs geschnittenes Kapillargefäß. Weiß markiert unauffällige Kardiozytenkerne.

Von neun Patienten, bei denen Adenovirus - DNA nachgewiesen wurde, besaßen lediglich zwei Patienten erhöhte Apoptoseraten von 0,18 % und 1,8 %, dies ergab einen Mittelwert von 0,22 % bei einer Standardabweichung von 0,60. Ähnliche Werte ergaben sich für die Gruppe der Zytomegalie - positiven Patienten mit einer durchschnittlichen Quote von 0,34 %.

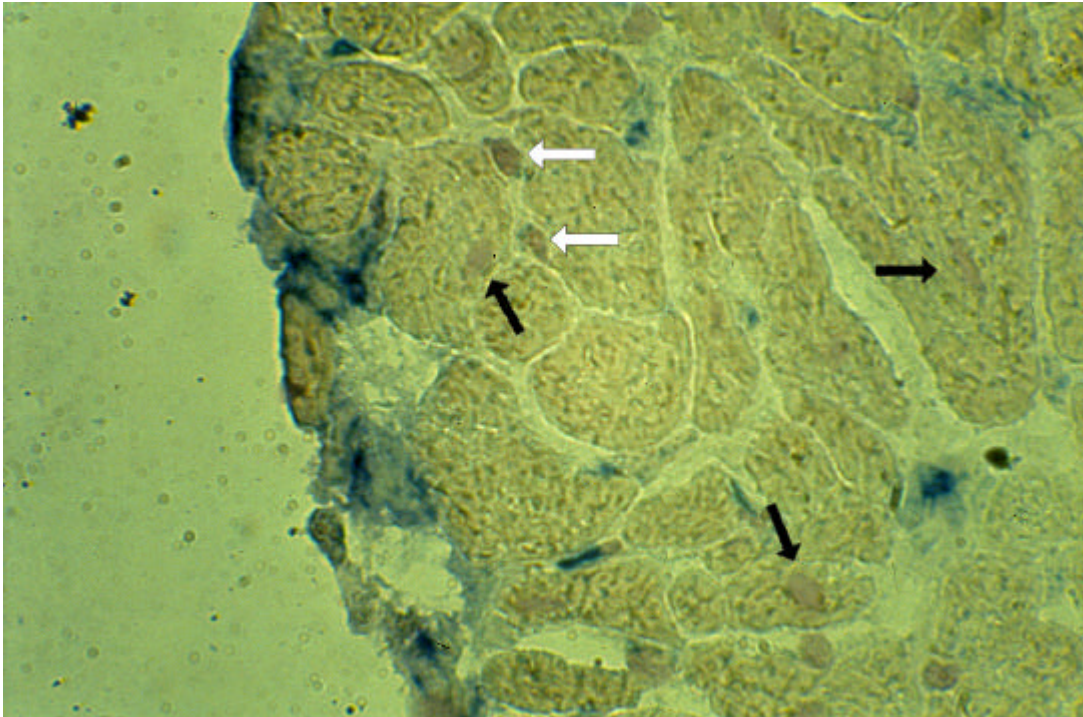


Abbildung 3.14: Myokardbiopsie einer CMV Genom - positiven Kardiomyopathie. Erkennbar ist am linken Bildrand blau angefärbtes Endokard. Die schwarzen Pfeile zeigen unauffällige Kardiozytenkerne, die weißen Pfeile markieren interstitielle Zellen.

Kein Nachweis für Apoptose konnte im Fall des Enterovirus erbracht werden. Sehr niedrig fiel auch der Prozentsatz in der Gruppe der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie aus, es fand sich hier ein Anteil von 0,08 %. Bei der Kontrollgruppe, wurde ein Apoptoseindex von 0,02 % ermittelt, wobei die Standardabweichung hier bei 0,05 lag. Ein eindeutiges Ergebnis wurde in der Positivkontrolle mit DNase I erzielt. Hier waren nahezu alle Zellkerne TUNEL - positiv .

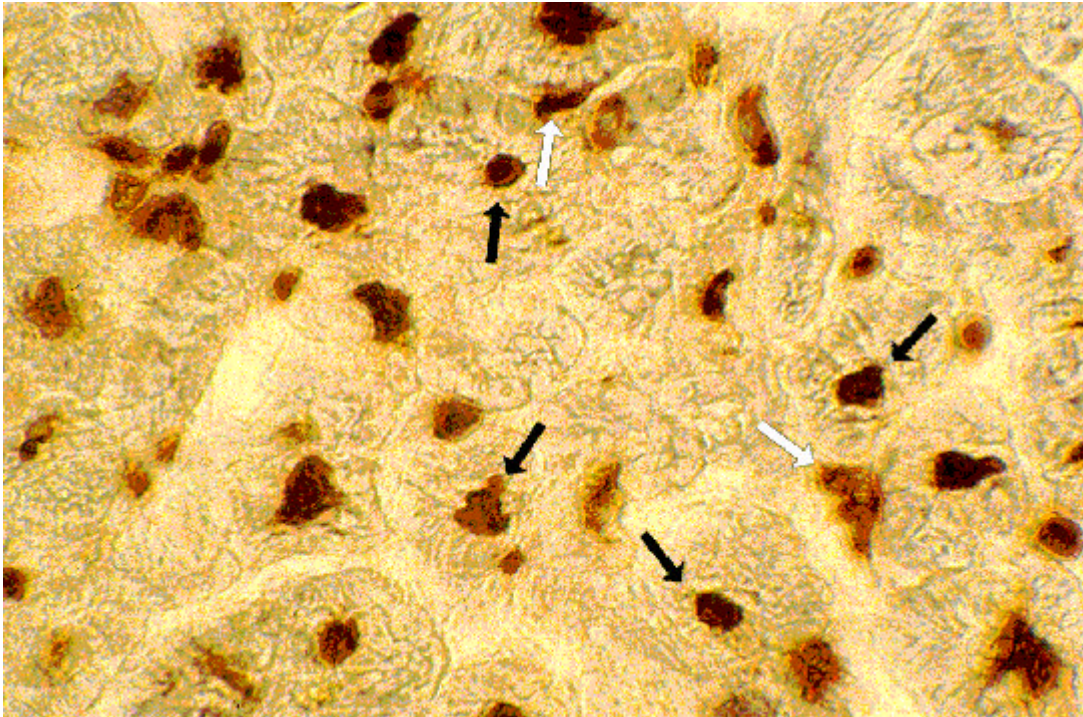


Abbildung 3.15: Inkubation mit DNase I (1 U/ml) für 15 min bei 37° C. Die schwarzen Pfeile zeigen exemplarisch positiv gefärbte Kardiozytenkerne, die weißen Pfeile markieren gefärbte Fibrozytenkerne

Die detaillierte Auflistung der Einzelergebnisse zeigen Tabellen 3.9.1 bis 3.9.3

akute Myokarditis	Nr. [1]	Geschlecht [m/w]	Alter [J]	Kardiozyten [1/ mm ²]	positive Kardiozyten [1/ mm ²]	positive Kardiozyten [%]
	1	w	42	125	7,70	6,15

chronische Myokarditis (n=8)	2	m	51	281	0	0
	3	m	64	219	8,33	3,81
	4	w	73	250	0	0
	5	w	58	288	0,50	0,18
	6	w	61	219	0	0
	7	m	31	238	1,14	0,48
	8	m	58	275	0	0
	9	m	75	156	6,25	4,0
Mittelwert			58,88	240,75	2,03	1,06
Median			59,50	244	0,25	0,09
SD			13,79	43,50	3,32	1,65
S.E.			4,88	15,38	1,17	0,58

DCMi (n=9)	10	m	81	269	0	0
	11	m	34	263	0	0
	12	m	58	250	0	0
	13	m	57	319	0,78	0,24
	14	m	55	263	0	0
	15	w	48	238	0	0
	16	m	28	119	0	0
	17	w	28	250	2,0	0,75
	18	m	48	200	0	0
Mittelwert			48,56	241,22	0,1	0,11
Median			48	250	0	0
SD			17	55,42	0,28	0,25
S.E.			5,66	18,47	0,093	0,083

Tabelle 3.9.1: Ergebnisse der Myokardbiopsien; SD: Standardabweichung; S.E.: Standardfehler

	Nr. [1]	Geschlecht [m/w]	Alter [J]	Kardiozyten [1/ mm ²]	positive Kardiozyten [1/ mm ²]	positive Kardiozyten [%]
Borderline- myokarditis ADV (n=9)	19	w	25	344	0	0
	20	m	58	219	0	0
	21	m	53	331	0	0
	22	m	55	331	0	0
	23	w	52	325	0	0
	24	m	70	281	0,52	0,18
	25	m	36	169	3,13	1,80
	26	m	42	300	0	0
	27	m	51	238	0	0
Mittelwert			49,11	282	0,41	0,22
Median			52	300	0	0
SD			13,14	60,72	1,04	0,6
S.E.			4,38	20,24	0,34	0,2

Borderline- myokarditis CMV (n=6)	28	m	51	313	0	0
	29	w	57	313	0	0
	30	m	64	319	1,04	0,32
	31	w	70	306	5,16	1,7
	32	m	55	300	0	0
	33	m	33	344	0	0
Mittelwert			55	315,83	1,03	0,34
Median			56	313	0	0
SD			12,73	15,28	2,06	0,68
S.E.			5,20	6,24	0,84	0,28

Borderline- myokarditis EV (n=7)	34	w	45	344	0	0
	35	w	48	300	0	0
	36	m	34	306	0	0
	37	m	45	344	0	0
	38	m	58	331	0	0
	39	m	55	294	0	0
	40	m	38	325	0	0
Mittelwert			46,14	320,57	0	0
Median			45	325	0	0
SD			8,55	20,69	0	0
S.E.			3,23	7,82	0	0

Tabelle 3.9.2: Ergebnisse der Myokardbiopsien; SD: Standardabweichung; S.E.: Standardfehler

	Nr. [1]	Geschlecht [m/w]	Alter [J]	Kardiozyten [1/ mm ²]	positive Kardiozyten [1/ mm ²]	positive Kardiozyten [%]
DCM (n=15)	41	m	36	250	1,56	0,62
	42	m	47	281	0,83	0,30
	43	m	52	288	0,25	0,09
	44	m	40	206	0	0
	45	m	39	238	0,46	0,19
	46	m	60	181	0	0
	47	m	38	313	0	0
	48	m	44	169	0	0
	49	w	39	206	0	0
	50	m	38	313	0	0
	51	m	54	369	0	0
	52	w	61	350	0	0
	53	m	58	388	0	0
	54	m	63	306	0	0
	55	w	49	275	0	0
Mittelwert			47,87	275,53	0,21	0,08
Median			47	281	0	0
SD			9,55	67,01	0,44	0,17
S.E.			2,47	17,3	0,11	0,04

Kontrolle (n=12)	56	w	39	325	0	0
	57	w	50	344	0	0
	58	w	57	363	0	0
	59	w	58	344	0	0
	60	m	42	375	0	0
	61	m	52	350	0	0
	62	m	52	375	0,54	0,14
	63	w	53	388	0	0
	64	w	72	363	0,31	0,09
	65	m	19	388	0	0
	66	m	16	356	0	0
	67	m	20	388	0	0
Mittelwert			44,17	363,25	0,07	0,02
Median			51	363	0	0
SD			17,60	20,33	0,17	0,05
S.E.			5,08	5,87	0,05	0,01

Tabelle 3.9.3: Ergebnisse der Myokardbiopsien; SD: Standardabweichung; S.E.: Standardfehler

Aus dieser Tabelle ergibt sich folgende grafische Darstellung:

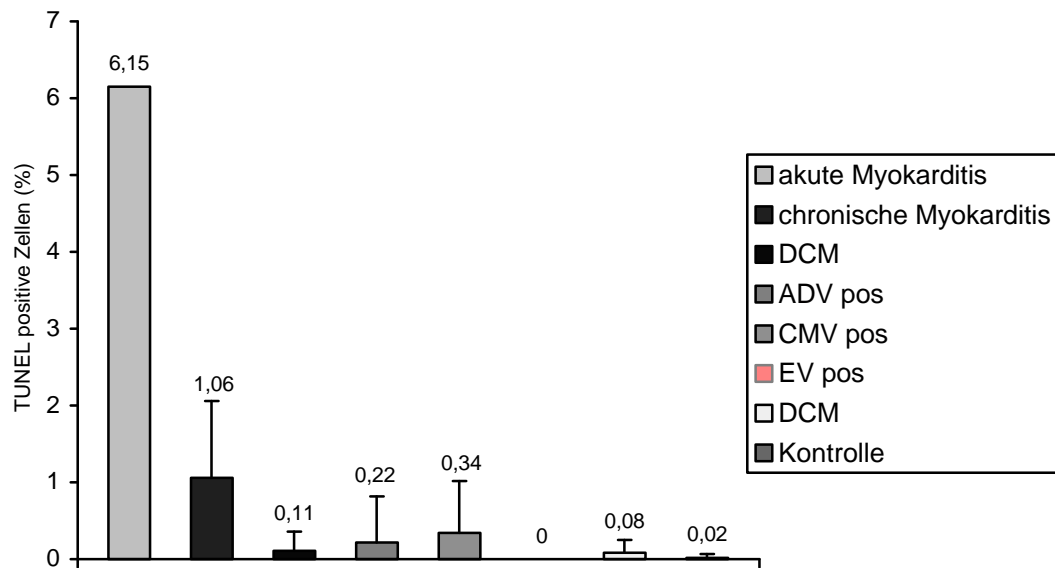


Abbildung 3.15: grafische Darstellung der Biopsieergebnisse mit Standardabweichung

4. Diskussion

Mehrere Methoden wurden zum Nachweis einer Apoptose bislang verwendet (McGahon et al., 1995). Am häufigsten beschrieben sind der TUNEL – Test, die Annexin / Propidiumjodid - Färbung sowie das DNA – laddering.

Apoptose als physiologischer, ATP - konsumierender Prozess, zeichnet sich durch spezifische morphologische Charakteristika aus.

Im frühen Stadium finden sich eine Verdichtung des Chromatins und die Anlagerung an die innere nukleäre Membran. Später nimmt das Zellvolumen ab und es kommt zur Abschnürung so genannter „apoptotischer Körperchen“. Es handelt sich hierbei um membranumschlossene Zellorganellen und Kernanteile. Diese apoptotischen Körperchen werden im Verlauf in vivo von Phagozyten und Nachbarzellen aus dem Gewebe eliminiert.

Im Gegensatz hierzu zeichnet sich die Nekrose am Anfang durch eine Zellschwellung, später durch den Verlust der Zellmembranintegrität aus.

Durch den Austritt lytischer Enzyme und Botenstoffe führt dieses im Gewebe zu Entzündungsreaktionen. In vitro folgt der späten Apoptose aufgrund unzureichend vorhandener phagozytierender Zellen zwangsläufig auch der Membranzusammenbruch, dies wird auch als sekundäre Nekrose bezeichnet (Abb. 4.1.1; Abb. 4.1.2).

Apoptose – morphologischer Verlauf in vitro:

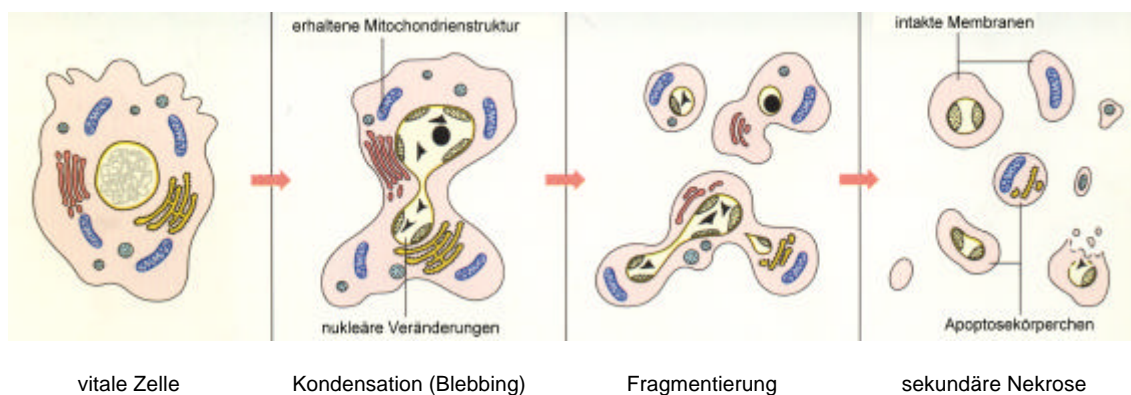


Abbildung 4.1.1 : Morphologischer Vergleich zwischen Apoptose und Nekrose

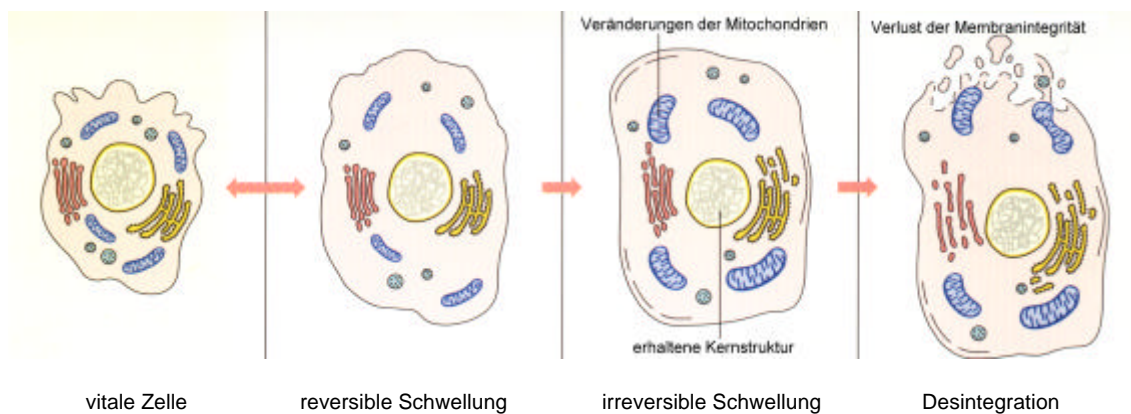
Nekrose:

Abbildung 4.1.2 : Morphologischer Vergleich zwischen Apoptose und Nekrose.

(Abbildung 4.1.1 und 4.1.2 mit freundlicher Genehmigung der Firma Roche Diagnostics GmbH, modifiziert nach „Guide to Cell Proliferation and Apoptosis Methods“; S. 34, Fig. 12)

Eine Parallele liegt in der Fragmentation der DNA, die bei der Apoptose gerichtet geschieht, bei der Nekrose hingegen durch freigesetzte lytische Enzyme zufällig erfolgt. Daran wird bereits das Problem deutlich, in der Zellkultur zwischen nekrotischen und spätapoptotischen Zellen zu differenzieren.

Ein weiteres Phänomen ist das Auftreten atypischer Apoptosen, bei denen ein oder mehrere Charakteristika fehlen können. Um also in vitro die Spezifität des Apoptosenachweises zu erhöhen, müssen mehrere Nachweismethoden kombiniert werden.

4.1. Diskussion der Methoden

4.1.1. Zellsysteme

Da es bei dieser Arbeit um die Frage der Beteiligung von Apoptose bei Kardiomyopathien ging, war die Wahl der Zellsysteme, an denen die Methodik etabliert werden sollte, von verschiedenen Faktoren abhängig.

Es wurden folgende Anforderungen gestellt:

- 1) unkomplizierte Kultivierbarkeit und möglichst stabiles Wachstum
- 2) humane Zellen
- 3) optische Identifizierung sollte leicht möglich sein

In der Literatur wurden verschiedene Zellsysteme vorgestellt, die zur Untersuchung apoptotischer Vorgänge benutzt wurden. Häufig wurde mit menschlichen Thymozyten gearbeitet. Ebenso sind Versuche mit Keratinozyten (Reinartz, 1996) oder Lymphozyten (Marini, 1996) beschrieben.

Da es für Arbeiten am Herzen kein Standardzellmodell gibt, wurden verschiedene Zell - Linien in Vorversuchen auf ihre Verwendbarkeit hin untersucht.

Von den geprüften Zell - Linien stellten sich die humanen Fibroblasten als adhärent wachsende Zellen und die HL – 60 Zellen (humanen Lymphozyten) als Suspensionszelllinie als geeignet heraus. Vorteilhaft war, dass die HL – 60 Zell - Linie gut standardisiert ist und durch Chemotherapeutika und Strahlung leicht Apoptose induziert werden kann (Kaufmann et al., 1989; Del Bino et al., 1990, 1991 und 1992).

Da sich die Fibroblasten durch keines der verwendeten Agenzien zur Apoptose stimulieren ließen, wurden die Nachweismethoden an den HL – 60 Zellen etabliert und validiert.

4.1.2. Nachweisverfahren

Die verwendeten Methoden, die Annexin / Propidiumjodid - Färbung, das DNA – laddering und der TUNEL – Test weisen die Apoptose alle aufgrund unterschiedlicher Charakteristika nach.

Die Färbung mit Annexin / Propidiumjodid - Färbung bietet einen relativ einfach durchzuführenden, schnellen und spezifischen Test. Von Vorteil zeigt sich ebenfalls die Detektion der apoptotischen Zellen in einem sehr frühen Stadium (van Engeland et al., 1998). Es kommt hinzu, dass die Verschiebung des Phosphatidylserins nach extrazellulär bei fast allen Zell - Linien nachweisbar ist und unabhängig von der apoptoseinduzierenden Substanz (Martin et al., 1995) aufzutreten scheint.

Die Auswertung kann durch Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie erfolgen. Die Durchflusszytometrie bietet hier den Vorteil einer Auswertung mit hoher Reliabilität.

Von Nachteil ist, dass lediglich vitale Zellen beurteilbar sind. Diese Färbung ist somit zur Einführung des Zellmodells nützlich, aber an Biopsien nicht einsetzbar. Ein weiteres Problem stellt die Beurteilung spätapoptotischer Zellzustände dar, bei denen die Zellmembran aufgrund erschöpfter ATP - Speicher ihre Integrität verliert und somit die Gegenfärbung mit Propidiumjodid positiv werden lässt (Koopmann et al., 1994).

Auf der Darstellung der für die Apoptose typisch fragmentierten DNA beruht das Verfahren des DNA – laddering.

Während der Apoptose erfolgt in der Zelle die Aktivierung spezifischer Enzyme, durch die typische DNA – Bruchstücke definierter Größe entstehen.

Bezüglich dieser Enzyme gibt es verschiedene Theorien. So werden z.B. NUC – 18 (Caron – Leslie et al., 1991), DNase I (Ucker et al., 1992; Peitsch et al., 1993) oder auch die DNase II (Barry et al., 1993) für die Fragmentation verantwortlich gemacht.

Dies scheint abhängig vom „Enzympotenzial“ der Zelle zu sein, da es auch morphologisch eindeutige Apoptose ohne entsprechende DNA - Fragmente zu geben scheint (Cohen GM et al., 1992; Gavrieli et al., 1992; Tomei et al., 1993).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Spaltung der DNA in zwei zeitlich nacheinander ablaufenden Schritten vollzogen wird (Walker et al., 1997).

Es scheint also die DNA – Leiter ein Apoptosecharakteristikum für spezielle Zell - Linien zu sein und keinesfalls eine unabdingbare Voraussetzung.

Für die in dieser Arbeit verwendeten HL – 60 Zellen wurde die internukleosomale DNA - Fragmentation 1996 von Kuribayashi et al. beschrieben, der ähnliche Resultate fand, wie die hier genannten.

Der große Vorteil des DNA - ladderings liegt in der eindeutigen Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose. Dieses ist auch in der Spätphase der Apoptose möglich.

Da der Nachweis über die gelelektrophoretische Trennung der DNA geschieht, ist eine Grundvoraussetzung eine Mindestanzahl von apoptotischen Zellen bzw. deren DNA. Diese wurde von Gong et al., 1994 mit ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen, bei einer Apoptoserate von ca. 8%, beziffert.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine DNA - Leiter ab einer Zellmenge von $5 - 6 \times 10^5$ Zellen mit einer Apoptoserate von 30 – 40% (durch den TUNEL – Test ausgewertet) gezeigt werden. Eine deutlichere Darstellung fand sich bei Erhöhung der Zellzahl auf das Doppelte.

Diese oben dargestellten Zellzahlen zeigen, dass diese Methodik aufgrund mangelnder Quantifizierbarkeit für die Beurteilung der Myokardbiopsie nicht infrage kommt.

Für die Untersuchungen an fixierten Kulturzellen auf der einen und Gewebebiopsien auf der anderen Seite ist der TUNEL – Test (terminal dUTP nick end labeling) geeignet. Das Testprinzip beruht, wie das DNA – laddering auch, auf der charakteristischen DNA - Fragmentierung, jedoch unabhängig vom Bruchstückmuster. Es resultiert aus dieser Fragmentierung eine Zunahme der freien 3' - OH Enden der DNA.

An diese Stelle wird mithilfe einer Transferase ein mit Fluoreszein - markiertes dUDP substituiert. Mit Peroxidase (POD) verknüpfte Fluoreszein - Antikörper binden an das Fluoreszein und nach POD - Substratzugabe kommt es zur selektiven Anfärbung im Bereich der fragmentierten DNA.

Wie oben erwähnt ist jedoch Apoptose ohne diese DNA - Fragmentierung möglich (Cohen et al., 1992) und der TUNEL – Test würde bei diesem Nachweis trotz eventuell auftretender morphologischer Charakteristika negativ ausfallen.

Die Unterscheidung zu nekrotischen Zellen stellt ebenfalls ein Problem dar, da es im Verlauf der Nekrose zu einer autolytischen DNA Zerstörung kommen kann. Dieses würde ein falsch positives Testergebnis bedeuten, da der Test an sich DNA – Brüche markiert (Gold et al., 1994; Collins et al., 1992; Grasl-Kraupp et al., 1995).

Um eine valide Aussage treffen zu können, empfehlen einige Autoren die Kombination von Färbung und morphologischen Merkmalen zur Beurteilung von apoptotischen Zellen (Takeda et al., 1996; Saraste, 1999).

Diese morphologischen Kriterien sind an der Myokardbiopsie sehr schwer zu beurteilen, so dass andere Autoren es vorziehen, anstelle des Ausdrucks Apoptose, von myokardialen DNA - Strangbrüchen zu sprechen (Seki et al., 1998).

Erschwerend kommt in der Untersuchung der Myokardbiopsie hinzu, dass apoptotische Zellen bzw. die Apoptosekörperchen in vivo durch Phagozyten und Nachbarzellen aus dem Gewebe eliminiert werden und somit nur eine definierte Zeit dem Nachweis zugänglich sind.

Von Bedeutung scheint ebenfalls die Wahl der Fixierung und deren Einfluss auf die Ergebnisse im TUNEL - Test zu sein.

Negoescu et al., kommen 1996 in einer ausführlichen Untersuchung zu dem Ergebnis, dass am Zellsystem alle Fixierungen mit entsprechender Vorbehandlung vergleichbare Ergebnisse liefern können. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen, die sich in unseren Versuchen zeigten. Für die Untersuchung von Myokardproben sind Formalin - (Olivetti et al., 1997) und Azeton - Fixierungen (Kawano et al., 1994) beschrieben, wobei bisher keine dieser Behandlungen als Goldstandard etabliert werden konnte.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Zellversuche

Apoptose lässt sich in HL – 60 Zellen durch Etoposid, Camptosar und UV - Bestrahlung induzieren.

Das DNA – laddering zeigte als qualitative Nachweismethode, dass es während des apoptotischen Geschehens in HL – 60 Zellen zu einer gerichteten DNA - Fragmentation kommt, es sich somit um den typischen Verlauf handelt.

Die deutlichsten Ergebnisse konnten bei der Inkubation mit Etoposid und der Bestrahlung mit UV – Licht dargestellt werden.

Diese beiden Induktionsmethoden wurden daher für die Auswertung durch die Annexin - Propidiumjodid Färbung, die mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde und den TUNEL – Test benutzt. Bei der quantitativen Auswertung ergaben sich zum Teil deutlich differierende Apoptoseindices für die beiden Testverfahren. Dieses Ergebnis dürfte von der Art der Induktion und der entsprechenden Nachweismethode abhängen.

Vergleicht man die Ergebnisse bei der Induktion mit Etoposid, so zeigt sich ein relativ paralleler Verlauf der Kurven, wobei die Apoptoserate beim Annexin - Nachweis etwas höher liegt. Dieses Ergebnis könnte dadurch verursacht sein, dass die Annexin - Färbung die Apoptose früher nachzuweisen vermag als der TUNEL – Test (van Engeland et al., 1998).

Die Kurve steigt von Beginn bis auf ein Maximum nach ca. 20 Stunden Nachinkubation an. Es folgt eine Stagnation und ein im TUNEL – Test nachgewiesener rapider Abfall nach 26 Stunden.

Über den gesamten Versuchszeitraum erfolgte kein Mediumwechsel, da hierdurch die Gefahr bestand, Zellen zu verlieren, z. B. während der Zentrifugationsschritte aufgrund veränderter Dichte durch die Bildung von „Apoptosekörperchen“.

Der fehlende Mediumwechsel führt zwangsläufig dazu, dass die nekrotischen und auch die apoptotischen Zellen, die in vitro natürlich nicht phagozytiert

werden, ihre Enzyme und Transmitter in das Medium entleeren und somit eine Wirkung auf noch vitale Zellen zumindest nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Versuche, in denen die Zellen der UV - Strahlung ausgesetzt waren, zeigten als Ergebnis im Gegensatz zur Etoposid - Induktion zu Beginn einen höheren Prozentsatz Apoptose – positiver Zellen im TUNEL – Test.

Dieses dürfte auf den Induktionsmechanismus zurückzuführen sein.

Die UV - Strahlung bewirkt in der Zelle unter anderem DNA - Einzelstrangbrüche und die so entstehenden freien 3' – OH – Enden sind der eigentliche Marker für den TUNEL - Test. Das wiederum könnte bedeuten, dass in diesem speziellen Fall Zellen als apoptotisch identifiziert werden, bevor die eigentliche Induktionskaskade abgelaufen ist.

Dass Apoptose tatsächlich stattgefunden hat, wurde im Vergleich mit der Annexin - Propidiumjodid Färbung und dem DNA – laddering validiert.

Dieses Phänomen verliert sich innerhalb von ca. 2 Stunden. Es zeigt sich dann erneut ein erhöhter apoptotischer Index in der Durchflusszytometrie.

Bereits nach 12 Stunden Nachinkubation lassen sich dann nahezu keine (0,8 %) vitalen Zellen mehr nachweisen. Im weiteren Verlauf ersichtlich wird ein Abfallen des apoptotischen Zellanteils zu Gunsten der nekrotischen Zellen. Diese Beobachtung könnte die bereits angesprochene These stützen, dass in vitro eine späte Apoptose auch als Nekrose missinterpretiert werden kann, daher sind diese Werte kritisch zu betrachten.

Der Anteil an apoptotischen Zellen in der Kontrollpopulation lag insgesamt unter 9 %. Hier fanden sich in der Durchflusszytometrie im Schnitt 5,8 % (SD : 1,98), im TUNEL – Test 3,6 % (SD: 1,28) apoptotische Zellen.

Es ist vorstellbar, dass es sich um relativ hohe Prozentsätze „Spontanapoptose“ handelt, da die HL – 60 Zellen eine Lymphozytenreihe darstellen, für die dies physiologisch ist.

Es ist bekannt, dass periphere Lymphozyten ohne jeglichen Stimulus eine Spontanapoptoserate bis zu 20 % besitzen (Genzlinger et al., 1997) und so wäre es denkbar, dass selbst veränderte Zellen wie die HL – 60 Linie noch einen erhöhten Umsatz besäßen.

Eine deutliche Abnahme der nachweisbaren apoptotischen Zellen zeigt sich im TUNEL – Test nach Etoposid Inkubation und UV Bestrahlung nach 26 Stunden. Es konnten in der mikroskopischen Auswertung lediglich noch Zellschatten und Detritus, geringe Mengen positiv gefärbter Zellen sowie nahezu keine intakten Zellen nachgewiesen werden.

Als Ursachen hierfür kommen mehrere Faktoren infrage:

- 1) Es könnten freigesetzte Mediatoren und lytische Enzyme die eventuell noch intakten vitalen Zellen zerstören.
- 2) Es sind vitale Zellen zum Beispiel bei der UV – Bestrahlung schon nach 12 Stunden fast nicht mehr nachweisbar. Das bedeutet, dass die Zellen hier entweder im Prozess der Apoptose oder der Nekrose begriffen wären und somit zwangsläufig auch zu Grunde gehen.

Insgesamt sollte die Auswertung der beiden Nachweissysteme kritisch betrachtet werden. Die oben diskutierten Störfaktoren bezüglich der Induktion und der Nachweise an sich, tragen sicher ebenso zu Ungenauigkeiten bei, wie auch die Tatsache, dass es sich bei der Auswertung mit Durchflusszytometrie um ein Apparateverfahren handelt, welches zumindest eine hohe Reliabilität sichert. Im TUNEL – Test hingegen ist die Auswertung immer gewissen individuellen Schwankungen der Untersucher unterlegen.

4.2.2 Endomyokardbiopsien

Als mögliche Ursache kardialer Dysfunktion wird in den letzten Jahren zunehmend eine Apoptose von Kardiocyten angenommen. Verschiedene Arbeiten am Tiermodell (Akiyama et al., 1997), speziell an dem der Ratte (Kajstura et al., 1995; Szabolcs et al., 1996), aber auch Untersuchungen an humanem Gewebe (Kawano et al., 1994; James et al., 1993; Olivetti et al., 1996) sind bereits durchgeführt worden. Dabei zeigten sich deutliche Hinweise

auf eine Beteiligung der Apoptose bei kardialen Erkrankungen. Untersuchungen über spezielle Transmitter im Herzen stützen diese Theorie.

Es konnten z.B. erhöhte Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF - alpha) - Spiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz nachgewiesen werden. Diese waren unabhängig von der auslösenden Grunderkrankung (Sato et al., 1996; Torre – Amione et al., 1996). Es zeigt sich TNF - alpha in vielen Zellmodellen als Induktor der Apoptose (Prins et al., 1997; Reinartz et al., 1996).

Als Untersuchungsmaterial wurden in den bisher veröffentlichten Arbeiten vornehmlich explantierte Herzen (Narula et al., 1996; Olivetti et al., 1997) oder Sektionsmaterial (Kawano et al., 1994; Saraste et al., 1997) verwendet.

Viele dieser Arbeiten befassten sich mit der Auswirkung von Ischämie und Reperfusion auf das Myokard. So fanden Saraste et al., (1997), die Untersuchungen an postmortal entnommenem Infarktgewebe vornahmen, besonders in den Randgebieten der Ischämie einen erhöhten Anteil von apoptotischen Kardiocyten (0,8 % im Gegensatz zur Kontrolle mit 0,007 %).

Die apoptoseinduzierende Wirkung von Ischämie und Reperfusion wurde auch von Gottlieb et al., (1994) und Fliss et al., (1996) am Tiermodell beschrieben.

Es fanden sich in der Literatur ebenfalls Hinweise, dass Apoptose an der Progredienz von dilatative Herzerkrankungen eine Rolle spielen könnte.

Yao et al., (1996) konnten bei der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie erhöhte DNase I - Aktivität im Myokard nachweisen.

Die DNase I scheint ihrerseits eine entscheidende Rolle bei der apoptotischen DNA - Fragmentierung zu besitzen (Peitsch et al., 1993). Auch im Tiermodell konnten Teiger et al. 1996 eine Erhöhung der Apoptoserate an Rattenherzen, die einer akuten Druckbelastung durch Aortenstenosierung ausgesetzt worden waren, zeigen. Diese fand sich besonders in den ersten sieben Tagen nach der Intervention.

Mechanische Belastungen, die zum Teil auch an der Genese der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie beteiligt sind, benutzten Cheng et al., (1995) und waren so in der Lage, an einem Papillarmuskel, der mit 50 mN / mm² gedehnt wurde, erhöhte Apoptoseraten zu ermitteln.

Narula et al. untersuchten 1996 Material von vier Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, wobei ein Patient zusätzlich zur Dilatation eine restriktive Komponente aufwies. Die Untersuchung wurde an Herzen durchgeführt, die während einer Transplantation entnommen wurden. Die Gewebeproben wurden mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, zum Apoptosenachweis wurde die TUNEL – Methode verwendet. Es zeigten sich in dieser Untersuchung in allen Proben hohe Apoptoseraten zwischen 5,0 % und 35,5 %.

Gewebe von Herzen, die während einer Transplantation entnommen wurden und Herzgewebe von Patienten die nach einem Myokardinfarkt verstorben waren, nutzten Olivetti et al. (1997). Sie untersuchten Material von drei Patientengruppen mit folgenden Erkrankungen: DCM, ischämische Kardiomyopathie und Herzklappenvitien sowie Kontrollen. Die Proben wurden in Formalin fixiert oder in flüssigen Stickstoff gefroren und zum Apoptosenachweis u. a. der TUNEL – Test benutzt.

Sie fanden bei den Patienten, die unter DCM litten, Apoptoseraten von 0,09 % – 0,63 % (im Mittel 0,237 %).

Es ergab sich hier ein deutlicher Unterschied zu den Ergebnissen, die durch Narula et al., 1996 beschrieben worden waren.

Die in dieser hier vorliegenden Arbeit dargelegten Ergebnisse zeigten bei den fünfzehn untersuchten Patienten in vier Fällen eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Rate an apoptotischen Kardiocyten (im Mittel 0,08 %).

Diese Ergebnisse lagen noch unter denen, die von Olivetti beschrieben worden waren.

Ob diese Ergebnisse jedoch direkt vergleichbar sind, sollte zumindest diskutiert werden.

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse stützen sich auf Myokardbiopsien, die in vivo über eine Katheteruntersuchung entnommen wurden. Das bedeutet auf der einen Seite eine Beschränkung der Materialmenge und eventuell der Qualität, auf der anderen Seite hingegen findet keine zeitlich Verzögerung zwischen vitaler Funktion und der Fixierung oder dem Einfrieren statt.

Diese Zeitspanne macht die Untersuchung an explantierten Herzen problematisch. Je nach Autor liegen zwischen der Materialentnahme

(Explantation oder Sektion) und der Verarbeitung 6 (Olivetti et al., 1997), bis maximal 50 Stunden (Saraste et al., 1997).

Ein weiterer Aspekt ist das Krankheitsstadium. Die Patienten, an deren explantierten Herzen die Untersuchungen von Olivetti und Narula durchgeführt wurden, zeigten den hämodynamischen Parametern wie EF (Ejektionsfraktion / %) und CI (cardiac Index / l/min/m²) nach ein weit fortgeschrittenes Krankheitsstadium, das ohne Transplantation auf Dauer nicht mit dem Leben vereinbar gewesen wäre.

Die Patienten in der hier vorgestellten Untersuchung zeigten zwar ebenfalls deutliche Krankheitssymptome wie z.B. Dyspnoe oder allgemeine Schwäche, zusätzlich fand man einen erhöhten LVEDD (linksventrikulärer enddiastolischer Diameter) und eine reduzierte EF (Ejektionsfraktion), sie waren jedoch unter medikamentöser Therapie zum Zeitpunkt der Untersuchung kompensiert.

Dies zeigt, dass die Patienten in den Untersuchungen von Narula und Olivetti an einer weiter fortgeschrittenen Herzerkrankung litten, als die Patienten deren Biopsiematerial in dieser Arbeit verwertet wurde.

Ein nur gering höherer Apoptoseindex zeigte sich in der Gruppe der Patienten mit Dilatation und Entzündungsnachweis (siehe Abb. 3.13 / Ergebnisse).

Hier waren apoptotische Kardiocytenkerne in zwei von neun Biopsien nachweisbar. Der Mittelwert der apoptotischen Kardiocyten lag bei 0,11 %.

Im Falle von entzündlichen Herzerkrankungen untersuchten Kawano et al. (1994) wie auch Seki et al. (1998) Material von Patienten mit Myokarditis.

Kawano et al. untersuchten drei Endomyokardbiopsien von Patienten mit akuter Myokarditis und drei mit chronischer Myokarditis. Als Kontrolle diente Sektionsmaterial. Die Fixierung erfolgte nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff mit Azeton. Der Apoptosenachweis erfolgte über den TUNEL – Test.

Bei keinem der Patienten mit akuter Myokarditis und nur einem der Patienten mit chronischer Myokarditis konnten apoptotische Myozytenkerne nachgewiesen werden.

Etwas differierende Ergebnisse zeigen Seki et al. (1998), die ebenfalls Biopsien von Patienten mit Myokarditis auswerteten. Sie fanden primär interstitielle

TUNEL - positive Zellen und nur einige ($< 12 / 4$ Gesichtsfelder (200 - fach)) positive Myozyten.

In der hier vorgelegten Studie zeigte sich die höchste Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten mit 6,15 % in der Myokardbiopsie des Patienten mit akuter Myokarditis.

Analog den Beobachtungen von Seki zeigten sich viele interstitielle Entzündungszellen positiv gefärbt, bei insgesamt deutlich eingeschränkter Beurteilbarkeit auf Grund starker Gewebeveränderungen. Ähnliche Beobachtungen beschrieben auch Akiyama et al. (1997), die Untersuchungen an Herzen vornahmen, die durch eine Ischämie geschädigt worden waren. Denkbar wäre, dass es sich bei dem Auftreten von positiv gefärbten Entzündungszellen um ein „postapoptotisches“ Phänomen handelt. Es wäre möglich, dass der positive Nachweis im TUNEL – Test auf die Phagozytose vieler apoptotischer Körperchen, d. h. abgeschnürter Zellfragmente, zurückzuführen ist, da diese auch fragmentierte DNA und somit auch freie 3' OH – Enden, enthalten können.

Ebenfalls höhere Ergebnisse zeigten sich in der Gruppe der chronischen Myokarditis. Vier von acht Biopsien zeigten einen erhöhten Apoptoseindex, wobei dessen Wert zwischen 0,18 % und 4 % schwankte und im Mittel bei 1,06 % lag.

Deutlich unter den Raten der chronischen Myokarditis lagen die ermittelten Werte der Gruppen der Borderline - Myokarditiden mit Virusgenomnachweis im Myokard.

Etwa zwei Dutzend Virusarten werden für die Entstehung dieser Myopathien verantwortlich gemacht. Das Spektrum reicht von Coxsackieviren über HIV (Human Immunodeficiency Virus) bis zum Lassa - Virus (Marboe et al., 1988). Eine besondere Rolle spielen hierbei Entero-, Adeno- und Zytomegalievirus (Pankuweit et al., 1998).

Die Erkenntnisse über die Rolle der Apoptose bei viral bedingten Myopathien sind bisher rar und auf wenige im Tierversuch induzierte Untersuchungen beschränkt (Yamada et al., 1999).

Es wurden Patientenbiopsien untersucht, in deren Myokard Adenovirus - und Zytomegalievirus - DNA, sowie Enterovirus - RNA (Jin et al., 1990) durch die Polymerase – Ketten - Reaktion (PCR) nachgewiesen werden konnte.

In der Gruppe der Adenovirus - positiven Patienten ergaben sich bei zwei von neun Patienten erhöhte Apoptoseraten mit 0,18 % und 1,8 % (im Mittel: 0,22 %). Die Zytomegalie - positiven Proben zeigten bei zwei von fünf Patienten einen Anstieg auf 0,32 % bzw. 1,7 % apoptotischer Zellen (im Mittel: 0,34 %) (siehe Abb. 3.14 / Ergebnisse).

In den Biopsien der Patienten mit nachgewiesenem enteroviralem Genom im Myokard, konnten keinen apoptotischen Kardiocyten gezeigt werden.

Man ersieht aus diesen Zahlen, dass die Apoptose bei der Pathogenese viraler Myokarditiden eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen, die aus den tierexperimentellen Untersuchungen hervorgehen.

Anhand der gewonnenen Werte der Patienten mit Enterovirus - Genom Nachweis kann eventuell ein „Apoptose - protektiver“ Effekt vermutet werden (Alter et al., 2001).

Aufgrund der Resultate, die bezüglich der dilatativen kardialen Erkrankungen veröffentlicht wurden, wäre es denkbar, dass die Apoptose weniger im Endstadium oder in relativ kompensierten Krankheitsstadien eine Rolle spielt, sondern vielmehr einen Teil der Gewebsreaktion in der akuten Belastungsphase des Myokards darstellt. Dieses würde sowohl die hier vorgestellten Ergebnisse, wie auch die im Tierexperiment erhobenen Daten erklären (Teiger et al., 1996).

Bei der Gesamtbetrachtung zeigt sich deutlich, dass die Aussagen bezüglich der Apoptose und ihrer Rolle bei der Entstehung und im Verlauf kardialer Erkrankungen weiterhin sehr kritisch betrachtet werden sollten.

Dieses liegt in erster Linie daran, dass es bisher keine Nachweismethode gibt, die uneingeschränkt nutzbar wäre. Das wird besonders in der Beurteilung von Biopsiematerial deutlich. Hinzu kommt ebenfalls die bisher fehlende Standardisierung in Bezug auf Fixierung und Vorbehandlung von Gewebeproben.

Ein weiterer Faktor scheint die eigentliche Verlaufsform der Apoptose im Gewebe, speziell im Myokard zu sein. Ist eine Zelle durch Apoptose zu Grunde gegangen, ist es in vivo nach einer gewissen Zeit nicht mehr möglich, dieses nachzuweisen, da die Zellfragmente phagozytiert werden.

Hieraus ergibt sich ein weiteres Problem, da es bisher keine Untersuchungen über die Verlaufsauer von apoptotischen Mechanismen in vivo gibt.

Ebenfalls unbekannt ist die Art des Gewebeersatzes. Es wäre auf der einen Seite ein fibrotischer Umbau, wie er für die Nekrose bekannt ist möglich, auf der anderen Seite wäre durch das relativ langsame Verschwinden der Zelle, durch das Abschnüren von Apoptosekörperchen, eine erneute Zellverbindung ohne Fibrose zumindest denkbar. Ein Ersatz der apoptotischen Zelle durch Zellteilung erscheint zumindest im Myokard als sehr unwahrscheinlich, da es sich im speziellen Fall um „postmitotisches“ Gewebe handelt, das die Fähigkeit zur Regeneration verloren hat.

Apoptose scheint also durchaus in der Progredienz von kardialen Erkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen, es bleibt jedoch offen zu welchem Zeitpunkt und durch welche Stimuli dieses geschieht.

An dieser Stelle sollten sich Untersuchungen anschließen, die Aufschluss über induzierende Faktoren, speziell im Herzen geben. Wenn man in der Lage wäre den genauen Zeitpunkt der apoptotischen Induktion zu bestimmen und entsprechende Transmitter zu beeinflussen, wären potenziell neue therapeutische Ansätze denkbar.

5. Zusammenfassung

Es wurden Endomyokardbiopsien von 67 Patienten auf apoptotische Aktivität hin untersucht. Der Nachweis wurde u. a. mit dem TUNEL – Test erbracht.

Der Apoptosenachweis am Zellmodell stützte sich qualitativ auf das DNA – laddering, eine vergleichende quantitative Auswertung erfolgte durch die Annexin / Propidiumjodid - Färbung und den TUNEL – Test.

Die Auswertung erfolgte beim TUNEL – Test lichtmikroskopisch, bei der Annexin / Propidiumjodid - Färbung mittels Durchflusszytometrie.

Zur Etablierung des TUNEL - Tests wurde ein Zellmodell mit HL – 60 Zellen erarbeitet, bei dem mit verschiedenen Methoden Apoptose induziert wurde.

Als Induktoren wurden Etoposid, Camptosar und UV – Bestrahlung verwendet.

Ein eindeutiger Apoptosenachweis konnte bei allen Induktionsmethoden gezeigt werden. Die höchsten Raten wurden mit 72 % Apoptose nach 15 - minütiger UV Bestrahlung und 12 Stunden Nachinkubationszeit ermittelt.

Für die Untersuchung an den Endomyokardbiopsien wurden die Patienten ihren Erkrankungen nach, in acht Gruppen eingeteilt:

Akute Myokarditis, chronische Myokarditis, entzündliche dilatative Kardiomyopathie (DCMi), Patienten mit Borderline Myokarditis und myokardialen Virusgenomnachweis mit den Untergruppen Adenovirus (ADV), Zytomegalie- (CMV) und Enterovirus (EV), idiopathische dilatative Kardiomyopathie (DCM) und die Kontrollgruppe.

Gegenüber der Kontrollgruppe zeigten sich erhöhte Apoptoseindizes bei akuter Myokarditis mit einem 300fach höheren Wert und eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) bei chronischer Myokarditis mit einer etwa 50- fachen Steigerung der Apoptoserate.

In den Gruppen mit DCMi, Borderline Myokarditis mit ADV-, und CMV- Genom Nachweis und DCM waren die Apoptoseraten zwischen 4- und 17- fach erhöht. Im Kontrast dazu konnte in der EV - Gruppe keine Apoptose festgestellt werden, sie lag somit unter Kontrollgruppenniveau.

Die erzielten Ergebnisse geben deutliche Hinweise auf eine Beteiligung der Apoptose an Entstehung und Progress kardialer Erkrankungen. Weitere

Untersuchungen, insbesondere über die induzierenden Botenstoffe könnten über eventuelle therapeutische Ansätze Aufschluß geben.

6. Literaturverzeichnis

Akiyama K, Gluckman TL, Terhakopian A, Jinadasa PM, Narayan S, Singaswamy S, Massey B 3rd, Bing RJ: Apoptosis in experimental myocardial infarction in situ and in the perfused heart in vitro. *Tissue Cell*. 1997; 29(6): 733 – 743

Alter P, Jobmann M, Meyer E, Pankuweit S, Maisch B: Apoptosis in myocarditis and dilated cardiomyopathy. Does enterovirus genome persistence protect from apoptosis? - An endomyocardial biopsy study. *Cardiovasc Path*. 2001; 10 (5): 229 - 234

Aretz T: The Dallas criteria. *Hum Pathol*. 1987; 18: 619 – 624

Barry MA, Eastman A: Identification of desoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys*. 1993; 300(1): 440 – 450

Bennett MR, Gibson DF, Schwartz SM, Tait JF: Binding and phagocytosis of Apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated by exposure of Phosphatidylserine. *Circ Res*. 1995; 77(6): 1136 – 1142

Caron-Leslie LM, Schwartzman RA, Gaido ML, Compton MM, Cidlowski JA: Identification and characterization of glucocorticoid-regulated nuclease(s) in lymphoid cells undergoing apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991; 40(4-6): 661 – 671

Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P: Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest*. 1995; 96(5): 2247 – 2259

Classen, Diehl, Kochsiek: Innere Medizin, 4. Auflage (1998) ; Urban & Schwarzenberg Verlag. Kapitel: Entzündliche Herzerkrankungen (Endokarditis, Myokarditis und Kardiomyopathien) von Prof. Dr. B. Maisch; 1185 - 1217

Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN: Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J.* 1992; 286 (Pt 2): 331 – 334

Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997; 326 (Pt 1): 1 - 16

Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS: Apoptosis and Programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol.* 1992; 10: 267 – 293

Collins RJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF: Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol.* 1992; 61(4): 451 – 453

Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE: Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature.* 1977; 270: 347 - 349

Del Bino G, Bruno S, YI PN, Darzynkiewicz Z: Apoptotic cell death triggered by camptothecin or teniposide. The cell cycle specificity and effects of ionizing radiation. *Cell Prolif.* 1992; 25(6): 537 – 548

Del Bino G, Skierska JS, Darzynkiewicz Z: The concentration-dependent diversity of effects of DNA topoisomerase I and II inhibitors on the cell cycle of HL-60 cells. *Exp Cell Res.* 1991; 195(2): 485 – 491

Del Bino G, Skierski JS, Darzynkiewicz Z: Diverse effects of camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I, on the cell cycle of lymphocytic (L1210, MOLT-4) and myelogenous (HL60, KG 1) leukemic cells. *Cancer Res.* 1990; 50(18): 5746 – 5750

Denk H: Zell- und Gewebereaktionen, Zelltod: Böcker, Denk, Heitz (Hrsg.); *Pathologie*. Urban und Schwarzenberg; 1997; 52- 53

Fesq H, Bacher M, Nain M, Gerns D: Programmed cell death in human Monocytes, infected by Influenza A Virus. *Immunobiology.* 1994; 190 (1-2): 175 – 182

Fliss H, Gattlinger D: Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res.* 1996; 79 (5): 949 – 956

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben – Sasson A: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992; 119(3): 493 – 501

Genzlinger A, Romanakis K, Janzowski C, Zankl H: Induktion von Apoptose durch 2- Cyclohexen-1-on bei 4 humanen Leukämiezelllinien sowie normalen Blutlymphozyten. 10. *Heidelberger Zytometrie Symposium.* 1997; ISSN 0949-5547, S.75.

Glucksmann A: Cell death in normal vertebrate ontology. *Biol Rev.* 1951; 26: 59 – 86

Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV, Lassmann H: Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest.* 1994; 71(2): 219 – 225

Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z: A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem.* 1994; 218(2): 314 – 319

Gottlieb RA, Burleson KO, Kliner Ra, Babior BM, Engler RL: Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1994; 94: 1621 - 1628

Grasl - Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Burschand W, Schulte Hermann R: In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology.* 1995; 21: 1465 – 1468

Hein S, Scholz D, Fujitani N, Rennollet H, Brand T, Friedl A, Schaper J: Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium, *J Mol Cell Cardiol.* 1994; 26(10) : 1291 – 1306

Henry WL, Gardin JM, Ware HW: Echocardiographic measurements in normal subjects from infancy to old age. *Circulation.* 1980; 62: 1054 – 1061

Holtz J, Heinrich H: Apoptose – was ist das? Bedeutung bei koronarer Herzkrankheit und Infarkt. *Herz.* 1999; 24: 196 -210

James TN, Terasaki F, Pavlovic ER, Vikhert AM: Apoptosis and pleomorphic micromitochondriosis in the sinus nodes surgically excised from five patients with long QT syndrome. *J Lab Clin Med.* 1993; 122(3): 309 – 323

Jin O, Sole MJ, Butany JW, Chia WK, McLaughlin PR, Liu P, Liew CC: Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Circulation.* 1990; 82(1): 8 –16

Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara JA, Chapnick S, Reiss K, Olivetti G, Anversa P: Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol.* 1996; 271(3 Pt 2): H 1215 – 1228

Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Krajewski S, Reed JC, Quaini F, Sonnenblick EH, Anversa P: Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp cell Res.* 1995; 219(1): 110 – 121

Kaufmann SH: Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.* 1989; 49(21): 5870 – 5878

Kawano H, Okada R, Kawano Y, Sueyoshi N, Shirai T: Apoptosis in acute and chronic Myocarditis. *Jpn Heart J.* 1994; 35, 6: 745 – 750

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26(4): 239 - 257

Koopman G, Reutlingsperger C, Kuitjen GA, Pals ST, van Oers MH: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994; 84(5): 1415 – 1420

Kuribayashi N, Sakagami H, Iida M, Takeda M: Chromatin structure and endonuclease sensitivity in human leucemic cell lines. *Anticancer Res.* 1996; 16(3A): 1225 – 1230

Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M: Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe heart failure. *N Engl J Med.* 1990; 323 (4): 236 – 241

Maisch B, Portig I, Ristic A, Hufnagel G, Pankuweit S: Definition der entzündlichen Kardiomyopathie (Myokarditis): Auf dem Weg zu einem Konsens. Ein Statusreport. *Herz*. 2000; 25: 200 – 209

Maisch B: Woran gehen Herzmuskelzellen zugrunde ? – Nekrose, Onkose und Apoptose. *Herz*. 1999; 24: 181 – 188

Maisch B: Einteilung der Kardiomyopathien nach der WHO / ISFC Task Force – Mehr Fragen als Antworten ? *Medizinische Klinik*. 1998; 93: 199 – 209

Maisch B: Ventricular remodeling. *Cardiology*. 1996; 87 Suppl 1: 2 – 10

Maisch B: Extrazelluläre Matrix und Interstitium des Herzens: „Restriktion“ ist häufiger als gedacht. *Herz*. 1995; 20: 75 – 80

Marboe CC, Fenoglio JJ Jr.: Pathology and natural history of human myocarditis. *Pathol Immunopathol Res*. 1988; 7(4): 226 – 239

Marini M, Musiani D, Cantoni O: Apoptosis of human lymphocytes in the absence or presence of internucleosomal DNA cleavage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 229 (3): 910 – 915

Martin SJ, Reutlingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl – 2 and Abl. *J Exp Med*. 1995; 182: 1545 – 1556

Maury CP: Tumor necrosis factor – an overview. *Acta med Scand*. 1986; 220(5): 387 – 394

McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR: The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol.* 1995; 46: 153 – 185

Nagata S, Golstein P: The Fas death factor. *Science.* 1995; 267(5203): 1449-1456

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo T, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA: Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 1996; 335,16: 1182 - 1189

Negoescu A, Lorimier P, Labat – Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E: In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem.* 1996; 44(9): 959 – 968

Nishigaki K, Minatoguchi S, Seishima M, Asano K, Noda T, Yasuda N, Sano H, Kumada H, Takemura M, Noma A, Tanaka T, Watanabe S, Fujiwara H: Plasma Fas ligand, an inducer of apoptosis, and plasma soluble Fas, an inhibitor of Apoptosis, in patients with chronic congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 29: 1214 – 1220

Nunez G, Merino R, Grillot D, Gonzalez – Garcia M: Bcl – 2 and Bcl – x: regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol Today.* 1994; 15, 12: 582 – 588

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, DiLoreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P: Apoptosis in the failing human heart. *N Eng J Med.* 1997; 336, 16: 1131 – 1141

Olivetti G, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, Gambert SR, Cigola E, Anversa P: Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996; 28: 2005 – 2016

Op de Kamp JA: Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem.* 1979; 48: 47 – 71

Pan H, Yin C, Van Dyke T: Apoptosis and cancer mechanisms. *Cancer Surv.* 1997; 29: 305 – 327

Pankuweit S, Hufnagel G, Eckhardt H, Herrmann H, Utrecht S, Maisch B: Cardiotropic DNA viruses and bacteria in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy with or without inflammation. *Med Klin.* 1998; 93(4): 223 – 228

Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschoop J: Characterization of the endogenous desoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J.* 1993; 12(1): 371 – 377

Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O`Rahilly S, Walker NI, Cameron DP: Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes.* 1997; 46 (12) : 1939 – 1944

Reinartz J, Bechtel MJ, Kramer MD: Tumor necrosis factor alpha induced apoptosis in a human keratinocyte cell line (HaCaT) is counteracted by transforming growth factor alpha. *Exp Cell Res.* 1996; 228(2): 334 – 340

Richardson P, McKenna W, Bristow M et al for the WHO / ISFC task force. Report of the 1995 World Health Organization / International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation.* 1996; 93: 841 - 842

Saraste A, Pullki K, Kallajoki M, Hendriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM: Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation*. 1997; 95: 320 - 323

Saraste A: Morphologische Kriterien und Nachweis von Apoptose. *Herz*. 1999; 24: 189 - 195

Sato Y, Takatsu Y, Ito H, Kataoka K, Takeuchi Y, Matsumori A: Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in patients with mitral valve disease and ventricular septum defect. *Heart Vessels*. 1996; 11(4): 218 – 220

Schaper J, Lorenz – Meyer S, Suzuki K: Die Rolle der Apoptose bei dilatativer Kardiomyopathie. *Herz*. 1999; 24: 219 - 224

Seki Y, Kai H, Kai M, Muraishi A, Adachi K, Imaizumi T: Myocardial DNA strand breaks are detected in biopsy tissues from patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Cardiol*. 1998; 21: 591 – 596

Shu-Jen C: ApopNet (1998), <http://www.apopnet.com/apopbase/intro.phtml>

Szabolcs M, Michler RE, Yang X, Aji W, Roy D, Athan E, Sciacca RR, Minanov OP, Cannon PJ: Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. Relation to induction of nitric oxide synthase. *Circulation*. 1996; 94(7): 1665 – 1673

Takeda K, Yu ZX, Nishikawa T, Tanaka M, Hosoda S, Ferrans VJ, Kasajima T: Apoptosis and DNA fragmentation in the bulbus cordis of the developing rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1996; 28: 209 – 215

Talley AK, Dewhurst S, Perry SW, Dollard SC, Gummuluru S, Fine SM, New D, Epstein LG, Gendelman HE, Gelbard HA: Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA. *Mol Cell Biol.* 1995; 15(5): 2359 – 2366

Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P: Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest.* 1996; 97(12): 2891 - 2897

Thatte U, Dahanukar S: Apoptosis – Clinical Relevance and Pharmacological Manipulation. *Drugs.* 1997; 54(4): 511 - 532

Tomei LD, Shapiro JP, Cope FO: Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1993; 90(3): 853 – 857

Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL: Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1996; 15: 93

Ucker DS, Obermiller PS, Eckhart W, Apgar JP, Berger NA, Meyers J: Genom digestion is a disapensable consequence of pysiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Mol Cell Biol.* 1992; 12(7): 3060 – 3069

Valente M, Calabrese F, Thiene G, Angelini A, Basso C, Nava A, Rossi L: In Vivo Evidence of Apoptosis in arrythmogenic right ventricular Cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 1998; 152: 479 – 484

van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger C: Annexin V- affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* 1998; 31: 1 – 9

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.

J Immunol Methods. 1995; 184: 39 – 51

Walker PR, Sikorska M: New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem Cell Biol*. 1997; 75(4): 287 – 299

Wyllie AH: Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980; 284: 555 – 556

Yamada T, Matsumori A, Wang WZ, Ohashi N, Shiota K, Sasayama S: Apoptosis in congestive heart failure induced by viral myocarditis in mice. *Heart Vessels*. 1999; 14(1): 29 - 37

Yao M, Keogh A, Spratt P, dos Remedios CG, Kießling PC: Elevated DNase I levels in human idiopathic dilated cardiomyopathy: an indicator of apoptosis? *J Mol Cell Cardiol*. 1996; 28: 95 – 101

Zachowski A: Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J*. 1993; 294: 1 – 14

7. Lebenslauf

Matthias Jobmann

Persönliche Angaben

- Familienstand: verheiratet
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Alter: 32 Jahre
- Geburtsort: Hamburg
- Ehefrau: Michaela Jobmann, geb. Wille, Krankenschwester
- Kinder: 1 Sohn, Michel Finn, * 29.12.2000
- Eltern: Richard Jobmann, Superintendent i. R.
Ines Jobmann, Bibliothekarin

Ausbildung

- | | |
|-------------|---|
| 1989 | Abitur an der Robert Koch Schule in Clausthal - Zellerfeld |
| 1990 – 1992 | Studium für Brauwesen und Getränketechnologie an der
TU München |
| 1992 - 1995 | Krankenpflegeausbildung im Landkreis Goslar
und Abschluß der Ausbildung mit staatlichem Examen |
| 1995 | Immatrikulation an der Philipps - Universität zu Marburg |
| 1997 | Ablegen der ärztlichen Vorprüfung |
| 1998 | Ablegen des ersten Abschnitts der ärztliche Prüfung |
| 2000 | Ablegen des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung |
| 2001 | Ablegen des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung |

Wehr-/Ersatzdienst

1989 - 1990: 15 Monate Grundwehrdienst als Sanitäter und San 1 Lehrgang
im Bundeswehrkrankenhaus Hamburg

beruflicher Werdegang

seit 12 / 2001: Arzt im Praktikum in der Klinik für Urologie und Kinderurologie
des Universitätsklinikums Marburg

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. B. Maisch, der es mir ermöglichte, die vorliegende Arbeit in seiner Klinik anzufertigen. Ein Dank ebenfalls für die freundliche Überlassung des Themas.

Für die Unterstützung, die mir von Seiten des kardiologisch – immunologischen Labors entgegengebracht wurde, möchte ich mich hiermit ebenfalls bedanken, besonders bei Frau Marlies Crombach, die mir beim Einstieg in die Laborarbeit stets mit Rat und Tat beiseite stand.

Für Diskussion, Kritik und Hilfe bei der Auswertung gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. Peter Alter, Frau Dr. rer. physiol. Sabine Pankuweit und Herrn Dr. med. Torsten Kruse.

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel
„ Apoptose bei strukturellen Herzmuskelerkrankungen “
im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. B. Maisch ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit oder Ergebnisse wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

- 1) Herz
- 2) Cardiovascular Pathology

Marburg, den 01 April 2002

Meine akademischen Lehrer waren:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Bolm, Czubayko, Engel , Geus, Gotzen, Griss,
Habermehl, Happle, Hofmann, Kälble, Kern, Klenk, Koolman, Kretschmer, Kroll,
Krieg, Lennartz, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Oertel, Rothmund,
Schachtschabel, Schulz, Seibert, Seifart, Voigt, Werner,
von Wichert

Publikationen:

Pankuweit S, Jobmann M, Crombach M, Portig I, Alter P, Kruse T, Hufnagel G, Maisch B: Zelluntergang bei entzündlichen Herzmuskelerkrankungen - Apoptose oder Nekrose? *Herz* (1999), 24: 211 – 218

Alter P, Jobmann M, Meyer E, Pankuweit S, Maisch B: Apoptosis in myocarditis and dilated cardiomyopathy. Does enterovirus genome persistence protect from apoptosis? - An endomyocardial biopsy study. *Cardiovasc Pathol* (2001), 10 (5): 229 - 235

Auszeichnungen:

1. Platz im Wettbewerb: „Young Masters“ mit dem Posterbeitrag:

Alter P, Meyer E, Jobmann M, Maisch B: Die Bedeutung von Zytokinen bei entzündlichen Herzmuskelerkrankungen - Korrelationen zur myokardialen Apoptose? 106. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Wiesbaden 29.04. - 03.05.2000

Posterbeiträge:

Alter P, Jobmann M, Pankuweit S, Meyer E, Maisch B: Apoptose bei Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie - eine Studie an Endomyokardbiopsien. 23. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung, Nürnberg, 01. - 02.10.1999, *Z. Kardiologie* 88, Suppl. 2, 1999

Alter P, Meyer E, Jobmann M, Pankuweit S, Maisch B: sFAS-Ligand, -Rezeptor und Zytokine bei Myokarditis und DCM - Korrelation zur Apoptose? 23. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung, Nürnberg, 01. - 02.10.1999, Z. Kardiologie 88, Suppl. 2, 1999

Alter P, Jobmann M, Meyer E, Pankuweit S, Maisch B: Apoptosis in patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy - An endomyocardial biopsy study. From genes to therapy in coronary heart disease and cardiomyopathy, Marburg, 08. - 09.10.1999, Herz 2000

Alter P, Meyer E, Jobmann M, Pankuweit S, Maisch B: sFAS-ligand, -receptor, and cytokines in myocarditis and DCM - correlation to apoptosis? From genes to therapy in coronary heart disease and cardiomyopathy, Marburg, 08. - 09.10.1999, Herz 2000

Alter P, Jobmann M, Meyer E, Maisch B: Apoptosis in myocarditis and dilated cardiomyopathy. 3rd Symposium on cytokines and apoptosis in the cardiovascular system, Halle 27.01. - 28.01.2000

Alter P, Meyer E, Jobmann M, Maisch B: Apoptosis, cytokines, sFAS-ligand, and receptor in dilated cardiomyopathy and myocarditis. 3rd Symposium on cytokines and apoptosis in the cardiovascular system, Halle 27.01. - 28.01.2000

Alter P, Meyer E, Jobmann M, Maisch B: Inhibition of apoptosis in human myocardium by enterovirus infection? 3rd Symposium on cytokines and apoptosis in the cardiovascular system, Halle 27.01. - 28.01.2000

Alter P, Meyer E, Jobmann M, Maisch B: Protection from apoptosis in human myocardium by enterovirus infection? Diagnosis and Management of dilated cardiomyopathy, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis Cedex, Frankreich, 16.03. - 18.03.2000

Alter P, Jobmann M, Meyer E, Maisch B: Apoptosis in dilated cardiomyopathy and myocarditis. Diagnosis and Management of dilated cardiomyopathy, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis Cedex, Frankreich, 16.03. - 18.03.2000

Alter P, Meyer E, Jobmann M, Maisch B: Cytokines, sFAS-ligand, and receptor correlated to apoptosis in dilated cardiomyopathy and myocarditis. Diagnosis and Management of dilated cardiomyopathy, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis Cedex, Frankreich, 16.03. - 18.03.2000

Alter P, Jobmann M, Meyer E, Maisch B: Apoptose an Endomyokardbiopsien - pathogenetische Relevanz bei akuter und chronischer Myokarditis. 106. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Wiesbaden 29.04. - 03.05.2000

Alter P, Meyer E, Jobmann M, Maisch B: Inhibition von Apoptose im Myokard durch Enterovirusinfektion? 106. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Wiesbaden 29.04. - 03.05.2000

Alter P, Meyer E, Jobmann M, Maisch B: Die Bedeutung von Zytokinen bei entzündlichen Herzmuskelerkrankungen - Korrelationen zur myokardialen Apoptose? 106. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Wiesbaden 29.04. - 03.05.2000

